

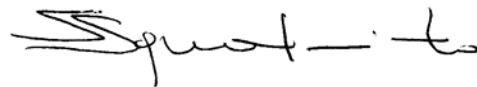
**Alma Mater Studiorum - Università di Bologna**

---

**FACOLTÀ DI SCIENZE MOTORIE**

**Dottorato di Ricerca in Discipline delle Attività Motorie e Sportive  
Ciclo XIX**

**Settore scientifico disciplinare BIO/16 Anatomia Umana  
Coordinatore: Chiar.mo Prof. Salvatore Squatrito**



**Modificazioni ultrastrutturali  
del tendine d'Achille durante lo stretching**

**Presentata da:  
Dott.ssa Marilisa Quaranta**

**Relatore: Chiar.ma Prof.ssa**

**Vittoria Ottani**  


**Correlatore:**

**Dott. Marco Franchi**

---

**Anno Accademico 2006/2007**

# INDICE

<b>INTRODUZIONE</b>	Pag. 4
<b>I TENDINI: ANATOMIA MACROSCOPICA</b>	Pag. 5
<b>COMPOSIZIONE DELLA MATRICE EXTRACELLULARE TENDINEA</b>	Pag. 8
<b>Collagene: struttura molecolare e assemblaggio</b>	Pag. 9
<b>Elastina</b>	Pag. 14
<b>Proteoglicani</b>	Pag. 15
<b>STRUTTURA GERARCHICA DEL TENDINE</b>	Pag. 22
<b>CELLULE TENDINEE</b>	Pag. 27
<b>INNERVAZIONE: organi tendinei del Golgi e stiramento muscolo-tendineo</b>	Pag. 32
<b>I CRIMPS TENDINEI</b>	Pag. 35
<b>CENNI DI MICROSCOPIA OTTICA A LUCE POLARIZZATA</b>	Pag. 36
<b>Concetti generali</b>	Pag. 36
<b>Il concetto di birifrangenza e la sua dimostrazione</b>	Pag. 37
<b>Il valore della birifrangenza e la sua determinazione</b>	Pag. 39
<b>Il microscopio polarizzatore</b>	Pag. 41
<b>I CRIMPS E IL COMPORTAMENTO MECCANICO DEL TENDINE</b>	Pag. 46
<b>Curva tensione-deformazione del tendine</b>	Pag. 48
<b>SCOPO DELLA TESI</b>	Pag. 57
<b>MATERIALI E METODI</b>	Pag. 60
<b>Procedura sperimentale e prelievo dei tendini</b>	Pag. 61
<b>Microscopia ottica a luce polarizzata (MLP)</b>	Pag. 62
<b>Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)</b>	Pag. 63
<b>Microscopia elettronica a scansione (SEM)</b>	Pag. 65

<b>Analisi isto-morfometrica</b>	Pag. 66
<b>RISULTATI</b>	Pag. 67
<b>Microscopia ottica a luce polarizzata (MLP)</b>	Pag. 68
<b>Microscopia elettronica a scansione (SEM)</b>	Pag. 68
<b>Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)</b>	Pag. 70
<b>Analisi isto-morfometrica</b>	Pag. 71
<b>DISCUSSIONE</b>	Pag. 72
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	Pag. 82
<b>ICONOGRAFIA</b>	Pag. 95

# **INTRODUZIONE**

## **I TENDINI: ANATOMIA MACROSCOPICA**

I tendini sono strutture anatomiche interposte tra i muscoli e le ossa che provvedono a trasmettere la forza prodotta dalla contrazione muscolare alle leve scheletriche, consentendo così il movimento nonché il mantenimento della postura del corpo. I tendini fanno sì che il muscolo si trovi ad una distanza ottimale dall' articolazione sulla quale esso agisce senza richiedere una eccessiva lunghezza del muscolo stesso tra l'origine e l'inserzione. I tendini sono più rigidi dei muscoli, posseggono maggiore resistenza alla trazione e possono sopportare carichi molto grandi con deformazioni minime. Questa proprietà dei tendini rende i muscoli capaci di trasmettere forze alla ossa senza disperdere energia per stirare i tendini. Il punto in cui il tendine trapassa nel tendine si definisce giunzione muscolo-tendinea, mentre il punto in cui il tendine si inserisce sull'osso si definisce giunzione osteo-tendinea. I tendini hanno colorito e lucentezza madreperlacea, consistenza fibroelastica e mostrano notevole resistenza alle sollecitazioni meccaniche ed ai processi autolitici. La forma dei tendini è strettamente collegata alla funzione che essi devono svolgere in rapporto all'azione specifica dei muscoli dai quali dipendono [30]; così muscoli deputati a compiere movimenti delicati e di precisione, come i flessori delle dita, possiedono tendini lunghi e sottili, mentre quelli che svolgono azioni di potenza e resistenza come il quadricipite e il tricipite surale hanno tendini più brevi e robusti. Generalmente i muscoli dotati ad una estremità di tendini lunghi hanno all'estremità opposta tendini brevi di tipo aponeurotico. Gli annessi tendinei sono strutture satelliti che alcuni tendini posseggono ai fini funzionali. Esse sono rappresentate da:

a) guaine fibrose o retinacoli, b) guaine sinoviali, c) foglietti peritendinei (paratenonio), d) pulegge di riflessione, e) borse tendinee. Il loro compito principale è quello di facilitare lo scorrimento del tendine sulle strutture anatomiche circostanti e di evitare che il tendine stesso perda la sua linea d'azione durante la contrazione muscolare.

Le guaine fibrose o retinacoli rappresentano i canali di scorrimento dei tendini, in particolare di quelli lunghi. Questi ultimi devono compiere lunghi tragitti per raggiungere la loro

inserzione: il loro scorrimento sui tessuti vicini potrebbe così essere notevolmente compromesso dall' attrito sviluppato soprattutto in corrispondenza di strutture ossee. In queste regioni sono presenti tunnel entro i quali i tendini scorrono avvolti da una guaina sinoviale. Le docce e le incisure ossee in particolare sono generalmente tappezzate da un pavimento fibrocartilagineo sul quale passa a ponte un tetto di tessuto fibroso. Questo rappresenta la guaina fibrosa o retinacolo, formazione che si riscontra elettivamente a livello delle estremità. Tipici esempi sono i retinacoli dei tendini flessori ed estensori della mano e del piede a livello del polso e del collo del piede.

Le guaine sinoviali hanno il compito di agevolare lo scorrimento del tendine all'interno della guaina fibrosa. Esse sono costituite da due sottili foglietti sierosi: il foglietto parietale che tappezza le pareti della guaina fibrosa e il foglietto viscerale che riveste la superficie del tendine. I due foglietti si continuano a livello delle due estremità del condotto formando così due "cul di sacco". Lo spazio chiuso delimitato dai due foglietti contiene un sottile velo di liquido: il liquido peritendineo che possiede all'incirca la stessa composizione del liquido sinoviale. Esso ha principalmente una funzione lubrificante in quanto il tessuto tendineo, a differenza della cartilagine articolare, possiede una vascolarizzazione propria. Peduncoli di tessuto fibrillare lasso si distaccano dalle pareti dei canali osteo-fibrosi e terminano sul ventre tendineo recando al tendine vasi e nervi. Queste strutture costituiscono il mesotenonio e sono anch'esse rivestite dalla sinoviale e possono essere più o meno numerose a seconda della lunghezza del tendine stesso.

Non tutti i tendini posseggono tuttavia delle vere e proprie guaine sinoviali; queste ultime infatti si possono riscontrare solo nelle zone in cui un repentino cambiamento di direzione ed un aumento dell'attrito richiedono una lubrificazione molto efficiente. La maggior parte dei tendini sono invece circondati da foglietti peritendinei di tessuto fibrillare lasso che nel loro complesso costituiscono il *paratenonio*. Il loro numero varia a seconda del tendine e della sua

situazione anatomica; il tendine di Achille umano, ad esempio, ne possiede due isolabili macroscopicamente.

I foglietti peritendinei hanno una funzione sovrapponibile a quella delle guaine sinoviali, pur presentando una struttura istologica differente. Il paratenonio risulta costituito da fibrille collagene di tipo I e III e da sottili fibre elastiche [88]; le fibrille collagene mostrano diametro variabile (da 35 a 220 nm) e risultano organizzate in grossi fasci disposti parallelamente al maggior asse tendineo [145]. Il paratenonio concorre a ridurre la frizione e funziona come una sorta di manicotto elastico che consente il libero movimento del tendine rispetto alle strutture circostanti.

Le pulegge di riflessione sono ispessimenti circoscritti di tessuto fibrillare denso situati lungo il decorso delle guaine fibrose. Esse hanno il compito di contenere il tendine all'interno del letto di scorrimento, soprattutto laddove vi siano delle curvature lungo il decorso del tendine. Si evitano così effetti "a corda d'arco" (dall'inglese bow string) che comprometterebbero notevolmente la funzionalità del tendine durante la contrazione muscolare.

Le borse tendinee infine costituiscono il quinto tipo di strutture extratendinee e concorrono a minimizzare l'attrito tra il tendine e le strutture ossee adiacenti. Si tratta di piccole vescicole sierose, localizzate nei siti ove una prominenza ossea può comprimere e quindi logorare il tendine; tipici esempi sono le borse subacromiale, infrapatellare e retrocalcaneale.

Al di sotto del paratenonio, l'intero tendine è circondato da una sottile guaina di tessuto connettivo denso denominata *epitenonio* [80, 90]. Insieme il paratenonio e l'epitenonio talvolta sono definiti *peritendine* [129]. All'interno dell'epitenonio le fibrille collagene risultano diversamente orientate, essendo disposte trasversalmente come pure longitudinalmente e obliquamente [80]. Occasionalmente le fibrille dell'epitenonio appaiono fuse con le fibrille tendinee poste più superficialmente [75]. Sulla sua superficie esterna l'epitenonio è contiguo al paratenonio e sulla superficie interna è invece in continuità con l'endotenonio, una sottile membrana di tessuto connettivo lasso che provvede a rivestire le

singole fibre del tendine e a raggrupparle in unità più grandi rappresentate da fasci di fibre di vario ordine. L'endotenonio risulta costituito da fibrille di diametro piccolo ed uniforme (50 nm) ed inoltre mostra una prevalenza delle cellule sulla componente fibrillare [145]; le cellule si dispongono a formare delle lamine monostratificate che risultano interposte tra i fasci di fibre del tendine e appaiono collegate da giunzioni specializzate in corrispondenza dei loro processi citoplasmatici. La funzione dell'endotenonio è quella di circoscrivere, individualizzandoli, i vari ordini di fasci ma anche quella di permettere la penetrazione e la distribuzione capillare di strutture vascolonervose all'interno del tendine [37, 82, 104]. Inoltre tra l'endotenonio e la superficie dei fasci tendinei vi è una relativa abbondanza di proteoglicani altamente idrofili e quindi idratati che favoriscono lo scorrimento reciproco tra i vari gruppi di fibre [124].

### **COMPOSIZIONE DELLA MATRICE EXTRACELLULARE TENDINEA**

I tendini sono costituiti da tessuto connettivo denso o compatto formato da cellule e da una matrice extracellulare (ECM); quest'ultima risulta costituita da fibre collagene ed elastiche immerse in una sostanza amorfa idrofila formata da proteoglicani (PGs), glicoproteine ed glicosaminoglicani (GAGs), con il collagene che rappresenta circa il 65-80% della massa secca del tendine [24, 56, 84, 105]. Il collagene prevalente nei tendini è quello di tipo I, accanto a proporzioni minori di collagene di tipo III, presente nell'epitenonio e nell'endotenonio [34] e di tipo II, identificabile nelle aree fibrocartilaginee della giunzione osteo-tendinea [47, 165].

I PGs e i GAGs hanno la capacità di trattenere notevoli quantità di acqua, pertanto la sostanza fondamentale amorfa mostra le proprietà di una soluzione colloidale molto vischiosa e forma un gel altamente idratato capace di resistere alla compressione e di ottimizzare le proprietà biomeccaniche (elasticità) del tendine. Queste molecole sono altresì importanti per la



stabilizzazione dell'intero sistema collagenico, per il mantenimento dell'omeostasi ionica e per la regolazione della fibrillogenesi.

### **Collagene: struttura molecolare e assemblaggio**

La caratterizzazione chimica del collagene ha richiesto lunghi periodi di studio a causa dell'insolubilità delle sue fibre. Il problema fu risolto quando si scoprì che il collagene poteva essere estratto in forma solubile dai tessuti giovani poiché la molecola non conteneva ancora molti legami trasversali. La mancanza di legami covalenti trasversali nel collagene immaturo consente infatti di estrarre dai tessuti l'unità strutturale di base, chiamata *tropocollagene*. Il tropocollagene ha una massa di circa 285 KD ed è costituito da tre catene polipeptidiche di uguale grandezza. La composizione delle tre catene polipeptidiche dipende dal tipo di collagene. Il collagene di tipo I è formato da due catene di un tipo, dette  $\alpha 1(I)$  e da una catena di un altro tipo, chiamata  $\alpha 2(I)$ . Le singole catene si avvolgono ad elica in senso sinistrorso ed inoltre le tre catene si avvolgono l'una sull'altra per formare un cavo superavvolto, ossia una superelica destrorsa (fig. 1). Nell'insieme la molecola ha la forma di un bastoncino lungo circa 300 nm con un diametro di 1,5 nm.

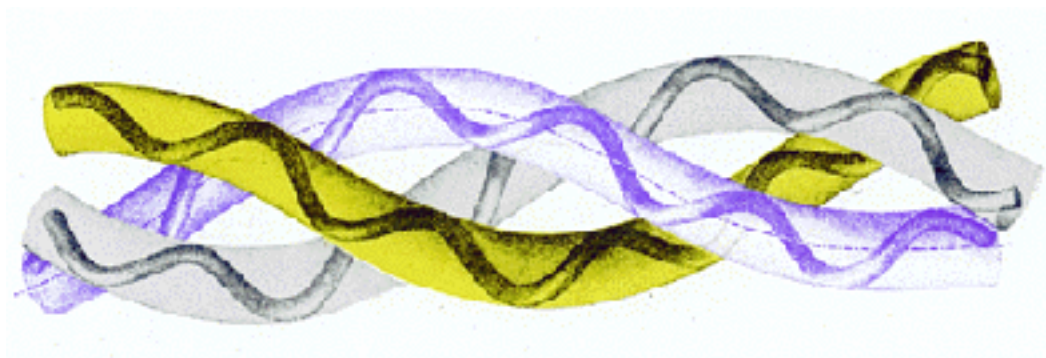


Figura 1: modello dell'elica a tripla catena del collagene.

L'analisi della composizione in aminoacidi ha rivelato che il tropocollagene contiene in elevate proporzioni tre aminoacidi: glicina (circa il 30%), prolina e idrossiprolina (circa il 25%) ed anche una discreta quantità di idrossilisina. La sequenza del collagene è molto regolare: nelle singole catene polipeptidiche un residuo ogni tre è glicina, inoltre la sequenza glicina-prolina-idrossiprolina è ripetuta frequentemente. Poiché non esistono gli RNA di

trasporto per gli aminoacidi idrossiprolina e idrossilisina, questi aminoacidi si formano nel corso di modificazioni post-traduzionali per idrossilazione rispettivamente della prolina e della lisina dopo essere state incorporate nelle catene polipeptidiche. Questi iminoacidi dirigono la conformazione ad elica in virtù dei loro limiti di rotazione, ed inoltre l'idrossiprolina contribuisce anche a stabilizzare la struttura a tripla elica formando legami a idrogeno fra una catena e l'altra [13, 14, 15, 160]. Altri legami ad idrogeno si stabiliscono tra i gruppi NH peptidici dei residui di glicina e i gruppi CO peptidici di residui presenti sulle altre catene. Le catene che costituiscono il tropocollagene vengono sintetizzate in forma di precursori più grandi detti rispettivamente pro-  $\alpha 1(I)$  e pro-  $\alpha 2(I)$ . Questi precursori contengono dei peptidi addizionali, detti *propeptidi* sia all'estremità aminoterminale che a quella carbossiterminale. I propeptidi hanno una composizione aminoacidica molto diversa dal resto della molecola: non presentano infatti disposizione ad elica per lo scarso contenuto in glicina e idrossiprolina. I propeptidi carbossiterminali delle tre catene inoltre sono legati tra loro da ponti disolfuro intercatena, assenti nella molecola definitiva del collagene. La molecola di collagene contenente i propeptidi è detta *procollagene* e la conversione in tropocollagene richiede quindi tagli proteolitici specifici. I fibroblasti secernono quindi nello spazio extracellulare procollagene e i propeptidi vengono rimossi all'esterno della cellula ad opera di proteasi specifiche, le procollagene peptidasi. La rimozione dei propeptidi è fondamentale per consentire il successivo assemblaggio delle molecole di tropocollagene in unità più complesse, rappresentate dalle fibrille [152]; pertanto i propeptidi prevengono la prematura formazione delle fibrille mantenendo in soluzione le molecole di procollagene. I propeptidi favoriscono inoltre la corretta e rapida aggregazione delle tre catene e contribuiscono alla stabilizzazione delle tripla elica del procollagene [38]. I due peptidi vengono rimossi in fasi successive della fibrillogenesi; in particolare la rimozione del propeptide N-terminale precede quella del peptide C-terminale e il suo distacco si accompagna ad un aumento del diametro fibrillare che si realizza attraverso la fusione di

segmenti fibrillari molto sottili [169]. Il propeptide C-terminale sembra quindi regolare fasi successive dell'assemblaggio del procollagene in fibrille e la sua rimozione favorirebbe quindi l'ulteriore crescita laterale delle fibrille.

Un problema non ancora risolto è come sia regolata l'ordinata polimerizzazione delle molecole di tropocollagene all'esterno della cellula. Una teoria suggestiva [19, 20] attribuisce alla superficie cellulare dei tenoblasti la funzione di controllare la formazione e l'orientamento delle fibrille in seno alla matrice extracellulare.

In particolare secondo questo modello i propeptidi verrebbero scissi enzimaticamente subito prima della secrezione e pertanto l'assemblaggio del procollagene avrebbe inizio entro il compartimento intracellulare; recenti osservazioni al microscopio elettronico hanno infatti evidenziato sottili aggregati fibrosi o segmenti fibrillari di 3-20 nm di spessore entro le vescicole di secrezione che si staccano dalla faccia trans del Golgi [19]. Queste vescicole si portano a ridosso di profondi recessi della membrana plasmatica ove quindi scaricano il proprio contenuto per esocitosi. Nello spazio extracellulare quindi questi segmenti fibrillari agiscono come strutture di nucleazione/propagazione e si accrescono sia in lunghezza che in diametro per fusione laterale e/o terminale [51, 141], oppure attraverso l'addizione di singole molecole collagene alle loro estremità [58, 59] dando quindi origine alle prime sottili fibrille collagene.

Il tropocollagene, una volta generato, tende ad uscire dalla soluzione e ad aggregarsi in modo specifico, formando le fibrille collagene. Quando le fibrille collagene sono sottoposte a colorazione con ioni di metalli pesanti e vengono esaminate al microscopio elettronico appaiono striate trasversalmente, cioè presentano lungo il loro decorso bande trasversali che si ripetono ogni 64 nm. Nella terminologia corrente si dice che le fibrille collagene mostrano una periodicità assile, con un periodo di 64 nm. Le ricerche sulla composizione macromolecolare delle fibrille collagene e sulla loro ricostituzione in vitro hanno posto un problema fondamentale, cioè come molecole di tropocollagene lunghe 300 nm si associno tra loro in

modo da formare fibrille con una periodicità di 64 nm. Poiché il periodo della fibrilla è minore della lunghezza del tropocollagene, le molecole disposte in file adiacenti non possono essere allineate. La prima interpretazione formulata era che durante la formazione delle fibrille le molecole di tropocollagene si allineassero longitudinalmente testa-coda e si associassero parallelamente sovrapponendosi per un quarto della loro lunghezza; questa disposizione sfalsata delle molecole darebbe origine alle striature trasversali che si ripetono regolarmente ad intervalli di 64 nm. Tuttavia tale ipotesi non risolveva interamente il problema, in quanto la disposizione latero-laterale di molecole lunghe circa 300 nm con una sfasatura di un quarto della loro lunghezza dovrebbe generare un periodo di circa 70 nm. Una modificazione di questa ipotesi, proposta da Hodge e Petruska [57], postula che le molecole di tropocollagene disposte linearmente lungo la fibrilla non siano collegate direttamente per le loro estremità ma vi sia interposto uno spazio corrispondente a circa mezzo periodo. Questa disposizione rende ragione dell'aspetto delle fibrille dopo colorazione negativa: le regioni della fibrilla che sono fortemente addensate per la sovrapposizione testa-coda delle molecole di tropocollagene sono relativamente impermeabili al colorante ed appaiono chiare; le regioni della fibrilla che corrispondono agli intervalli tra le molecole disposte linearmente sono più permeabili al colorante ed appaiono più scure (fig. 2). Secondo questo modello quindi:

- 1) ciascuna molecola di tropocollagene si estende per una lunghezza pari a  $4,4$  periodi  $D$  ove  $D$  corrisponde a 64 nm
- 2) le molecole adiacenti sono sfasate nel senso della lunghezza di una distanza  $D$  dando luogo a fibrille con periodo ripetitivo  $D$
- 3) ogni periodo è costituito da una zona chiara di sovrapposizione di  $0,4 D$  e da una zona scura di discontinuità di  $0,6 D$ .

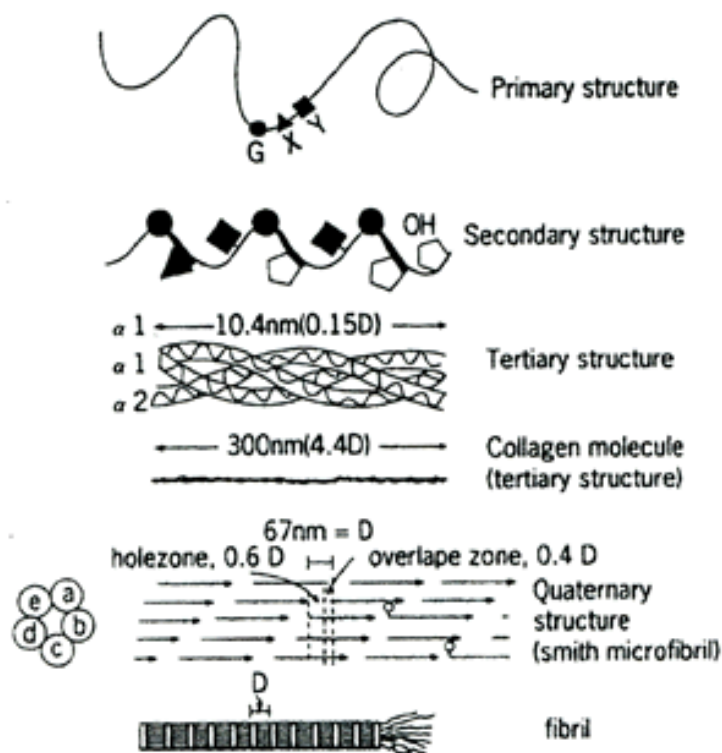


Figura 2: la periodicit  delle fibrille collagene   dipendente dall'allineamento sfasato delle molecole di tropocollagene.

Abbiamo visto che inizialmente interazioni non covalenti (polari e idrofobiche) fra le molecole collagene sono responsabili dell'aggregazione della fibrilla collagene, ma una volta che questa si   formata viene stabilizzata da legami trasversali (chiamati anche crociati o cross-links) covalenti tra le molecole [7, 40]. Tali legami iniziano quando un enzima elaborato dai tenoblasti, la lisil-ossidasi, trasforma il gruppo  $\epsilon$ -amminico della lisina e dell'idrossilisina in un gruppo aldeidico mediante deamminazione ossidativa [173]. I gruppi aldeidici cos  formati possono formare due tipi di legami stabili:

- il gruppo aldeidico di un residuo di lisina pu  condensarsi spontaneamente con il gruppo  $\epsilon$ -amminico contiguo non ossidato di un altro residuo di lisina formando un legame divalente del tipo base di Schiff; questi legami intramolecolari si costituiscono tra residui di lisina in regioni non ad elica vicino all'estremit  aminoterminale [8].
- legami intermolecolari trivalenti (idrossipiridinolici) cui partecipano due residui di idrossilisina e uno di lisina. Questi legami intermolecolari si costituiscono tra residui posti

all'estremità aminoterminale di una molecola di tropocollagene e residui localizzati nella regione carbossiterminale di un'altra molecola adiacente [46].

Con il tempo, il collagene va incontro a reazioni di glicosilazione non enzimatica (glicazione) che sembrano giocare un ruolo determinante nel processo di invecchiamento o senescenza dei tessuti connettivi [6, 7, 97, 139]. Il glucosio ed il fruttosio possono reagire in maniera non enzimatica con i gruppi aminici dei residui di lisina e arginina del collagene formando basi di Schiff prontamente reversibili ed i prodotti di Amadori più lentamente reversibili [119]. Questi ultimi possono andare incontro ad autossidazione, con formazione di radicali liberi altamente instabili (che possono prontamente reagire con altri residui di lisina e arginina), o a riarrangiamento, con formazione di prodotti intermedi che possono andare incontro ad ulteriore trasformazione per formare molecole irreversibili chiamate prodotti terminali di avanzata glicosilazione (AGE). La glicosilazione dei residui di lisina e la formazione di AGE determina quindi la formazione di cross-links glicosilati sia a livello intermolecolare che interfibrillare [5]. La quota di aminoacidi che vanno incontro a glicosilazione aumenta con l'età [6, 7, 9, 97, 139] e questo processo induce alcune importanti modificazioni nelle proprietà fisiche del collagene, in quanto le fibre collagene divengono insolubili, mostrano una maggiore resistenza meccanica e una aumentata stabilità termica [5].

Il numero di questi legami stabili di tipo covalente aumenta con l'avanzare dell'età, dando luogo ad un incremento della resistenza meccanica del tendine [6, 40, 85]. Il numero e il tipo di legami crociati varia inoltre con le richieste funzionali del tessuto: infatti il collagene del tendine di Achille che deve avere una notevole resistenza alla trazione contiene molti più legami crociati rispetto al tendine della coda, che invece deve possedere maggiore flessibilità [7, 40].

### **Elastina**

Le fibre elastiche costituiscono una componente minoritaria della matrice extracellulare tendinea in quanto le proprietà meccaniche del tendine, ed in particolare la resistenza alla

trazione, sono primariamente determinate dal collagene. Normalmente esse rappresentano l'1-2% del peso secco di un tendine [84], viceversa il numero e il volume di tali fibre aumenta in talune condizioni patologiche come nella sindrome di Ehlers-Danlos e nell'uremia cronica [73, 74].

Le fibre elastiche sono più abbondanti in corrispondenza della fibrocartilagine e delle aree di fibrocartilagine calcificata della giunzione osteotendinea. Hanno un diametro di 0.3-2.0  $\mu\text{m}$ , in genere non si aggregano in fasci ma decorrono isolate formando una fine rete irregolare attraverso il tessuto; al microscopio elettronico le fibre elastiche risultano formate da una porzione centrale (core) amorfa ed omogenea costituita da elastina e da una parte periferica formata da microfibrille della glicoproteina strutturale *fibrillina*, spesse circa 110 Å [74]. L'elastina viene sintetizzata dai fibroblasti sotto forma di un precursore, la tropoelastina, che si polimerizza nei tessuti extracellulari. La polimerizzazione richiede la presenza delle microfibrille di fibrillina che vengono incorporate intorno o all'interno dell'elastina. Il ruolo delle fibre elastiche nei tendini non è completamente chiaro; è stato suggerito che esse possano contribuire a ripristinare la struttura ondulata a zig-zag dei fasci di fibre in seguito allo stiramento che il tendine subisce durante la contrazione muscolare [18].

La componente elastica si modifica con l'età, aumenta fino all'età giovanile per poi diminuire nella senilità; il maggior numero di fibre elastiche riscontrato nel tessuto tendineo giovane è richiesto dalle particolari esigenze funzionali che l'apparato muscolo-scheletrico di un individuo giovane presenta [112].

### **Proteoglicani**

I proteoglicani (PGs) sono costituiti da un core proteico cui sono legate covalentemente una o più catene di glicosaminoglicani (GAGs). I GAGs sono costituiti da lunghe catene polisaccaridiche ciascuna delle quali è formata dalla ripetizione di unità disaccaridiche; una delle unità del disaccaride è solitamente un acido uronico e l'altra un aminosaccaride (N-acetilglucosammina o N-acetilgalattosammina). I GAGs sono macromolecole acide

polianioniche per la presenza di gruppi ossidrilici, carbossilici e solfato sulle unità dei disaccaridi. Vengono distinti in: solforati (condroitinsolfati A, B e C, cheratansolfato, dermatansolfato, eparansolfato) e non solforati (acido ialuronico). L'acido ialuronico (HA) è il GAG più rappresentato nei connettivi lassi ed è l'unico privo di gruppi solfato. I GAGs solforati differiscono dall'HA perchè sono legati covalentemente a proteine con le quali formano i proteoglicani. I PGs, a loro volta, possono formare legami non covalenti con catene di HA formando quindi complessi molecolari ancora più grandi. A differenza di molte proteine, i GAGs non sono abbastanza flessibili da formare aggregati globulari, ma rimangono in una forma espansa, occupando così un volume abbastanza grande in relazione alla loro massa. Inoltre i gruppi laterali, elettricamente molto carichi, rendono queste molecole molto idrofiliche; sono quindi in grado di legare un notevole volume di acqua e ioni positivi che costituiscono nel loro complesso il fluido extracellulare. Tale fluido è responsabile del caratteristico turgore del tessuto connettivo.

La sostanza fondamentale è così formata soprattutto da GAGs, PGs e dalla loro acqua di idratazione; l'insieme forma un gel flessibile attraverso cui i metaboliti idrosolubili possono agevolmente diffondere. La dimensione dello spazio tra le molecole di GAGs e la natura delle cariche elettrostatiche concorre a costituire una sorta di setaccio molecolare che determina quindi la permeabilità caratteristica di ciascun tipo di tessuto connettivo.

Nel tendine è stata dimostrata la presenza di due gruppi fondamentali di PGs (fig. 3):

i piccoli proteoglicani ricchi in leucina (small leucine-rich proteoglycans o SLRPs)

i grandi proteoglicani, talora noti anche come PGs modulari o (ialectani).



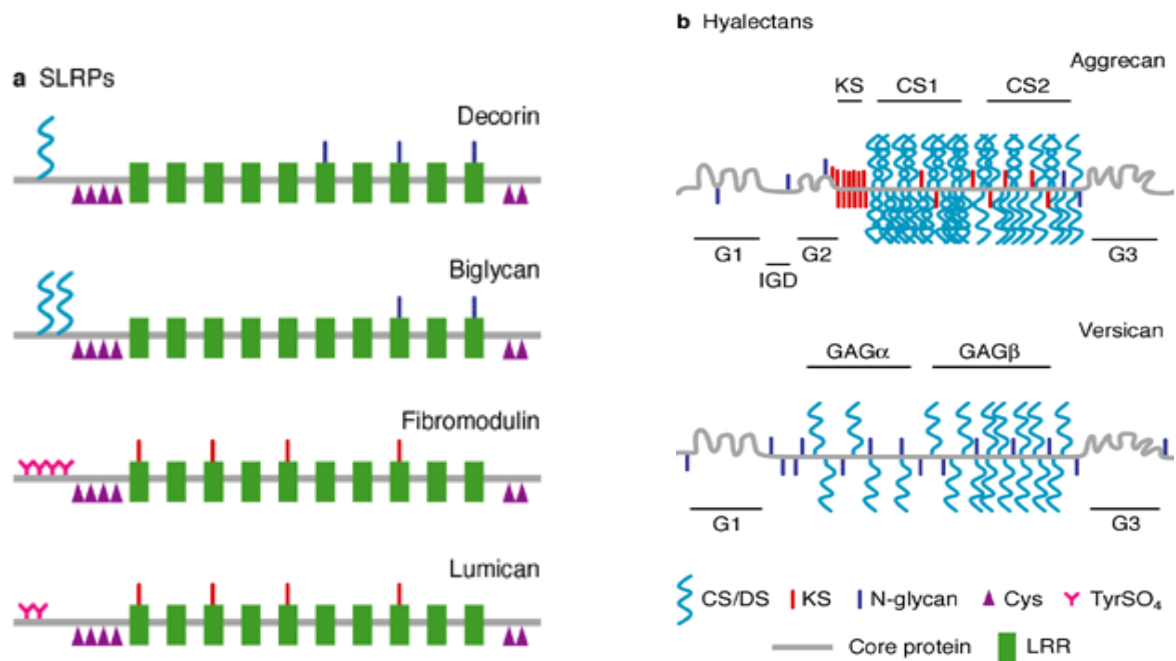


Figura 3: rappresentazione schematica dei principali proteoglicani presenti nel tendine  
(Export Reviews in Molecular Medicine – Cambridge University Press 2005)

I SLRPs sono caratterizzati da sequenze ripetute ricche di leucina, tipicamente costituite da 20-30 amminoacidi con residui di leucina in posizioni conservate (fig. 3). Questi PGs hanno un piccolo core proteico (~40 KDa) al quale sono legate una o due catene di condroitinsolfato (CS) o dermatansolfato (DS) oppure più numerose catene di cheratansolfato (KS). I SLRPs più rappresentati nel tendine sono: decorina, biglicano, fibromodulina e lumicano; tutti questi PGs sono in grado di legarsi alle fibrille collagene e di modulare il processo della fibrillogenasi [174].

I grandi PGs, come l'aggrecano e il versicano sono ricchi in CS o KS e il core proteico presenta domini multipli, di cui quello N-terminale interagisce con l'acido ialuronico (fig. 3). Si tratta di molecole idrofile cariche negativamente capaci di trattenere una quantità di acqua pari a 50 volte il loro peso. Sono per la maggior parte localizzati intorno e tra le fibre e le fibrille collagene. In virtù della elevata densità di cariche fisse e delle forze di repulsione elettrostatica questi PGs sono tesi rigidamente e conferiscono resistenza alle sollecitazioni tensili e pressorie. La composizione e il contenuto in PGs si modifica nelle diverse parti del

tendine in funzione delle differenti richieste funzionali; così nella porzione tensile (soggetta cioè prevalentemente a tensione) i SLRPs prevalgono sui grandi PGs costituendo rispettivamente il 90% e il 10%, mentre nelle zone sottoposte a compressione vi è una maggior quantità assoluta di PGs, tuttavia le quantità relative dei PGs piccoli e di quelli macromolecolari sono all' incirca equivalenti [162, 163].

La concentrazione di GAGs nel tendine è considerevolmente minore rispetto a quella della cartilagine o di altri tessuti connettivi. La zona tensile di un tendine contiene circa lo 0,2% di GAGs di cui ben il 60% è rappresentato dai DS, mentre le zone sottoposte a pressione e in particolare la giunzione osteotendinea contiene una quantità di GAGs compresa tra il 3.5% e il 5%, con una netta prevalenza di CS (65%). L' acido ialuronico costituisce circa il 6% dei GAGs totali presenti nel tendine.

L'assemblaggio (fibrillogenesi) del collagene di tipo I, il principale componente strutturale dei tendini, ha luogo durante lo sviluppo embrionale ed inoltre durante il rimodellamento tendineo, processo attraverso il quale il tendine risponde a variazioni del carico e della mobilizzazione (esercizio). Numerosi studi indicano che la fibrillogenesi, la velocità di formazione e le dimensioni finali delle fibrille collagene sono regolate dai proteoglicani (PGs) presenti nella matrice extracellulare [26, 41].

La decorina è il PG più abbondante nel tendine, contiene un core proteico ricco di leucina cui sono legate una o due catene di DS; si localizza sulla superficie delle fibrille collagene, come a decorarle (dove il nome) e si ritiene possa regolare l'interazione interfibrillare [51]. Più precisamente secondo Scott [133] la decorina si lega in modo non covalente alle fibrille collagene attraverso il core proteico, mentre la catena di DS si estende in direzione di una fibrilla adiacente e si associa testa-coda con la catena di DS (avente orientamento antiparallelo) di una molecola di decorina legata a tale fibrilla; in questo modo si costituiscono dei ponti interfibrillari (fig. 4a-b) che contribuiscono a mantenere a registro le fibrille e ad impartire a quest' ultime un ordinato allineamento parallelo.

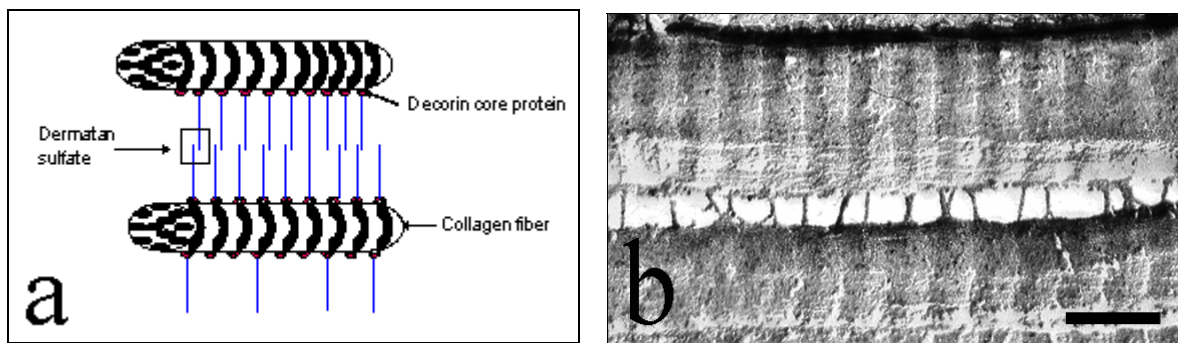


Figura 4: in (a) rappresentazione schematica delle interazioni decorina-fibrille collagene; in (b) freeze-etching: le catene glicosaminoglicaniche della decorina formano ponti interfibrillari disposti perpendicolarmente (barra della scala = 0.2  $\mu\text{m}$ ).

La decorina viene considerata un regolatore cruciale dell'assemblaggio della matrice in quanto limita il diametro delle fibrille collagene e quindi interviene nella modulazione del rimodellamento tendineo in risposta al carico tensile [94]. La presenza della decorina sembra promuovere la fusione coda-coda tra fibrille e viceversa inibire la fusione laterale, regolando così sia il diametro che la lunghezza delle fibrille [51]. Il coinvolgimento della decorina nella fibrollogenesi viene dimostrata dalla osservazione che i topi knock-out per il gene della decorina hanno una pelle estremamente fragile, incapace di resistere a repentini stiramenti [26]. L'esame al microscopio elettronico della cute di questi animali evidenzia che, in assenza di decorina, le fibrille collagene appaiono spesse, irregolari e con un arrangiamento spaziale casuale.

Il biglicano, altro membro della famiglia dei SLRPs, come la decorina possiede dieci ripetizioni ricche in leucina e due catene di DS legate al core proteico. Come la decorina, è in grado di legarsi al collagene di tipo I e viene espresso principalmente nel tendine e nell'osso come pure nel derma e nei vasi sanguigni. Le fibrille collagene dei tendini di topi knock-out per il gene del biglicano mostrano diametri più piccoli e una morfologia alterata [174]. Questi topi knock-out sviluppano tendini ectopici e mostrano ossificazione delle articolazioni accompagnata da osteoartrite entro i primi tre mesi di vita. Queste alterazioni appaiono più pronunciate nei topi knock-out sia per il biglicano che per la fibromodulina; l'assenza di

entrambi i PGs impedisce la formazione di fibrille collagene mature e ciò si traduce in tendini più deboli con una ridotta stiffness. In questi animali la fibrocartilagine va incontro ad ossificazione nel tentativo di sopperire alla ridotta resistenza del tendine [2]. La fibromodulina, come la decorina agirebbe come modulatore della fibrillogenesi, tuttavia diversamente dalla decorina, essa sembra promuovere la formazione di grosse fibrille collagene sia in vivo che in vitro [72]. La fibromodulina viene espressa ad elevati livelli nel tendine, condivide con il lumicano (un altro membro della famiglia dei SLRPs) un comune sito di legame sul collagene di tipo I, ma questo sito è distinto da quello della decorina. I topi knock-out per la fibromodulina mostrano una ridotta stiffness tendinea (accresciuta lassità) e un aumento compensatorio di lumicano; nei tendini di questi animali si osserva un marcato incremento di fibrille collagene immature di piccolo calibro [72]. Queste osservazioni portano a pensare che la fibromodulina normalmente promuova la maturazione delle fibrille collagene e contribuisca a conferire al tendine elevata resistenza meccanica e robustezza [41].

Il lumicano è un SLRP strettamente affine alla fibromodulina con la quale condivide un comune sito di legame sul collagene di tipo I. Gli studi su topi knock-out indicano che il lumicano può sostituirsi funzionalmente alla fibromodulina nei topi privi di questo PG [174]. Tuttavia topi privi di lumicano producono fibrille collagene di grosso calibro che formano una matrice disorganizzata nella cornea e nel derma; l'assenza del lumicano comunque non sembra determinare alcuna modificazione delle proprietà meccaniche del tendine e pertanto si può concludere che la fibromodulina sia più importante del lumicano nell'influenzare le prestazioni meccaniche del tendine [72].

L'aggrecano, dopo la decorina, è il secondo PG più abbondante nei tendini; è una macromolecola altamente glicosilata con numerose catene di CS e KS legate al core proteico (fig. 5); ogni molecola contiene circa cento catene di CS e un numero minore di catene di KS (fino a 60). Numerose molecole di aggrecano possono legarsi all'HA formando complessi

polianionici ad alto peso molecolare; questa interazione è favorita da una piccola glicoproteina che agisce come proteina di legame.

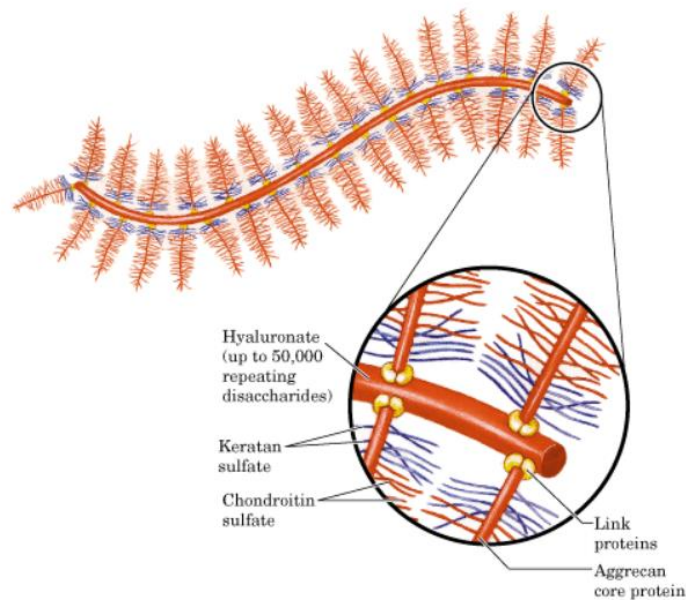


Figura 5: rappresentazione schematica dell' aggrecano.

L'elevato numero di cariche negative si traduce in una maggiore pressione osmotica e quindi in una aumentata idratazione del tessuto. L'acqua di idratazione esercita una pressione di turgore sul network collagenico, infatti è proprio il mantenimento dell'aggrecano in una forma espansa entro il network collagenico inestensibile che produce una pressione di turgore e rende il tessuto resistente alla compressione con la minima deformazione possibile. L'aggrecano contribuisce inoltre insieme agli altri PGs a costituire una rete tridimensionale che funziona come un setaccio molecolare in grado di impedire il passaggio di alcune molecole, facilitando alternativamente la diffusione di altre.

I GAGs solforati in generale conferiscono resistenza alla compressione, i CS essendo più abbondanti nei tessuti tensili e i KS nei tessuti sottoposti a compressione. Nelle aree del tendine soggette prevalentemente a tensione e a minore compressione l'aggrecano espresso

contiene sia CS che KS, mentre nelle aree sottoposte a prevalente compressione prevalgono le catene di KS [154].

Le parti del tendine soggette a compressione rivelano la presenza di aggrecano e collagene di tipo II, che sono i tipici costituenti della cartilagine. L'aggrecano contribuisce alla viscoelasticità in modo significativo ed agisce come un lubrificante consentendo alle fibrille di slittare più agevolmente le une sulle altre [174]. L'aggrecano come pure il versicano si lega all'acido ialuronico (HA), un polisaccaride inusuale che ha una semplice struttura chimica ma straordinarie proprietà. È un polimero lineare di ampie dimensioni, carico negativamente, composto da ripetizioni di un disaccaride costituito da acido glucuronico e N-acetilglucosamina [174].

L'HA svolge molte e diverse funzioni: grazie alle sue proprietà idrodinamiche contribuisce direttamente all'omeostasi e alla biomeccanica dei tessuti; le sue associazioni con proteine (ialaderine) e con proteoglicani come l'aggrecano e il versicano sono fondamentali per l'integrità delle matrici extracellulari e pericellulari. Infine, mediante l'interazione con specifici recettori di membrana, l'HA è in grado di influenzare comportamenti cellulari come la proliferazione, il differenziamento e la migrazione.

Le sollecitazioni tensili e quelle pressorie hanno un diverso impatto sulla espressione dei PGs nei tendini; è stato dimostrato che la tensione meccanica induce prevalentemente la sintesi della decorina, mentre la produzione dell'aggrecano verrebbe stimolata dalla compressione [120, 121].

### **STRUTTURA GERARCHICA DEL TENDINE**

I tendini mostrano un'architettura strutturale gerarchica (fig. 6): nel primo livello, scala molecolare, è possibile individuare le molecole di tropocollagene che interagendo dapprima mediante legami non covalenti e successivamente legami "cross-link" si organizzano in maniera sempre più complessa fino a formare microfibrille che, a loro volta, si impacchettano

per formare unità chiaramente visibili al microscopio elettronico, le fibrille collagene. Studi al freeze-etching e al microscopio elettronico a trasmissione hanno dimostrato che le fibrille collagene risultano infatti costituite da subunità filamentose dette subfibrille o microfibrille [16], di lunghezza compresa tra i 4 e i 20 nm; all'interno delle singole fibrille le microfibrille possono mostrare un arrangiamento rettilineo o elicoidale a seconda del particolare ruolo funzionale che le fibrille rivestono nel tessuto connettivo.

Si può pertanto parlare di polimorfismo fibrillare e le fibrille collagene presenti nei tessuti connettivi si possono infatti suddividere in due classi [106]:

- fibrille di tipo T, caratterizzate da un diametro elevato ed eterogeneo e da una disposizione parallela; tali fibrille sono tipicamente presenti in tessuti sottoposti ad elevate forze tensili unidirezionali (tendini, legamenti, aponeurosi)
- fibrille di tipo C, con diametro minore ed omogeneo (distribuzione unimodale) caratterizzate da un andamento elicoidale e/o ondulato; presenti in tessuti sottoposti a forze pluridirezionali o a cospicui e reversibili cambiamenti di forma e dimensione (cute, cornea, guaine tendinee, guaine di nervi, parete dei vasi)

Le fibrille di tipo T presentano una bandeggiatura regolare (periodo), che si ripropone ogni 67 nm e risultano costituite da microfibrille con disposizione quasi rettilinea rispetto all'asse fibrillare; tali microfibrille mostrano in realtà un arrangiamento lievemente spiraliforme in quanto si avvolgono a costituire un'elica destrorsa con un angolo di avvitamento che non eccede mai i 5 gradi [106, 117, 125].

Le fibrille di tipo C presentano un periodo più raccorciato di 64 nm e le microfibrille costitutive mostrano un evidente arrangiamento elicoidale con un angolo di avvitamento costante di 17 gradi rispetto all'asse fibrillare [93].

Più fibrille collagene si aggregano a costituire una fibra collagene che si può considerare come l'unità di base costitutiva del tendine. Una fibra collagene è la più piccola unità del tendine

visibile al microscopio ottico e rappresenta la più piccola struttura collagenica testabile meccanicamente.

Le fibrille si aggregano quindi a costituire le fibre e queste si riuniscono a costituire fasci di vario ordine che nel loro complesso costituiscono il tendine. In particolare un gruppo di fibre collagene forma un fascio primario (subfascicolo) e più fasci primari, circondati dai setti endotenonici e dai vasi in essi contenuti, formano un fascio secondario (fascicolo). Un gruppo di fasci secondari o fascicoli forma quindi un fascio terziario ed infine l'insieme dei fasci terziari forma il tendine rivestito dall'epitenonio (fig. 6).

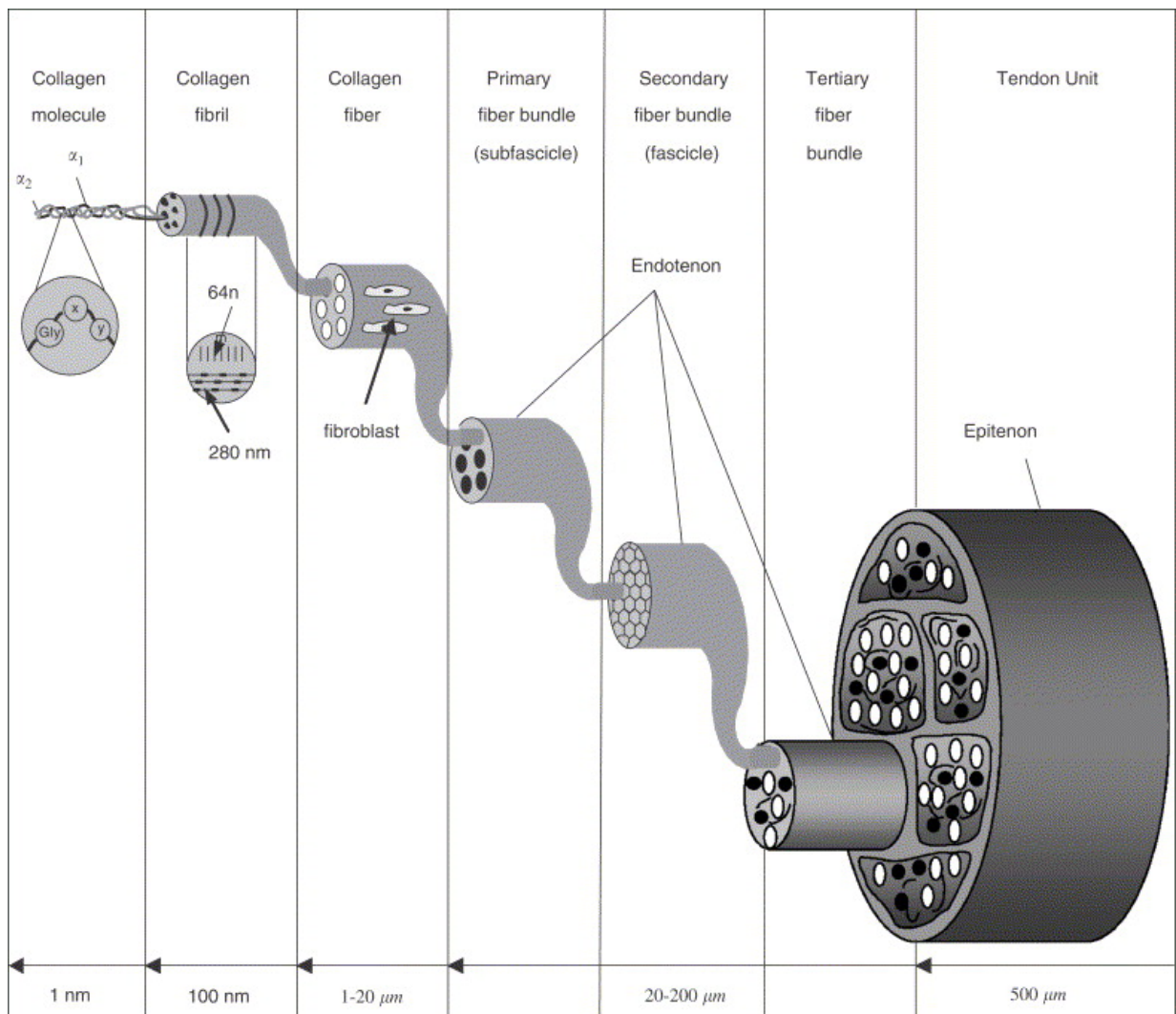


Figura 6: organizzazione gerarchica del tendine (modificato da Silver et al. 2003).



Vale la pena sottolineare che ad oggi non esiste una nomenclatura standard per definire i vari livelli di aggregazione delle fibrille nel tendine a causa della grande variabilità che si riscontra in tendini diversi [24, 37]. Il tendine in toto è quindi una struttura multifascicolata rivestita in superficie dall'epitenonio che lo avvolge completamente. All'interno del tendine i fasci di fibre terziari, i fasci di fibre secondari, i subfascicoli e le singole fibre collagene sono rivestiti e quindi separati gli uni dagli altri ad opera dell'endotenonio [82].

Nel tendine la maggior parte delle fibrille collagene è disposta parallelamente al maggior asse tendineo così da assicurare una resistenza ottimale agli stress tensili prevalentemente unidirezionali cui il tendine è sottoposto durante la contrazione muscolare. L'elevato carico meccanico che un tendine può sostenere è infatti giustificato proprio dalla sua particolare struttura, caratterizzata da fibrille collagene che risultano in massima parte allineate nella direzione di applicazione del carico stesso. Ciò che rende un tendine estremamente resistente alla trazione laddove la pelle, che pure contiene fibre collagene, è relativamente elastica o poco resistente, è proprio la distribuzione e l'orientamento delle fibre che nella pelle è del tutto casuale. Le proprietà meccaniche e la resistenza tensile del tendine sono strettamente correlate al diametro medio delle sue fibrille collagene [107]: le fibrille collagene con diametro elevato risultano più resistenti alla trazione per via della maggiore sezione trasversa e della maggiore densità di legami intramolecolari; le fibrille aventi diametro minore sono invece più flessibili, più resistenti allo scorrimento plastico ed inoltre in virtù di un elevato rapporto superficie/volume sono in grado di stabilire un maggior numero di connessioni interfibrillari [106]. In definitiva quindi fibrille di diametro differente rivestono diversi ruoli funzionali. Il tessuto tendineo per espletare in modo ottimale la sua funzione richiede sia resistenza alla trazione che resistenza allo slittamento plastico (creep resistance) e pertanto vi sarà una richiesta di entrambi i tipi di fibrille [107]. Nel tendine le fibrille collagene mostrano una distribuzione bimodale o plurimodale del diametro, con una prevalenza delle fibrille di piccolo diametro che si incuneano negli spazi compresi tra le fibrille più grosse.

Il diametro delle fibrille collagene varia ampiamente in tendini diversi essendo compreso tra 20 nm e 150 nm [36, 74]: nel tendine d'Achille umano, le fibrille hanno un diametro compreso tra 30 e 130 nm (per la maggior parte di esse il diametro è di 50-90 nm), mentre nei tendini dei muscoli flessori ed estensori delle dita il diametro è minore e si attesta su 20-60nm. Il diametro delle fibrille collagene varia inoltre in funzione dell'età, aumentando durante lo sviluppo e riducendosi con l'invecchiamento e il disuso [100, 107].

Le fibre collagene sono dunque costituite da un numero variabile di fibrille, che per la maggior parte sono disposte parallelamente le une alle altre e sono riunite in grossi fasci ad andamento rettilineo; al microscopio elettronico tuttavia è possibile osservare singole fibrille orientate anche trasversalmente ed orizzontalmente e gruppi di due o tre fibrille che si intrecciano tra loro a costituire spirali appiattite o strutture simili a trecce [75, 77].

Il diametro delle fibre collagene mostra ampia variabilità; oscilla tra 5 e 30  $\mu\text{m}$  nel tendine della coda di ratto [3], mentre nei tendini umani il diametro delle fibre può superare anche i 300  $\mu\text{m}$  [37]. Il diametro delle fibre dipende dal numero piuttosto che dalle dimensioni delle singole fibrille costitutive [37].

Nel tendine la maggior parte delle fibre sono disposte parallelamente all'asse tendineo stesso, una quota minore mostra invece un orientamento trasversale; infatti il rapporto tra fibre disposte longitudinalmente e trasversalmente varia tra 10:1 e 26:1 [75].

Nei tendini umani il diametro dei fasci terziari varia da 1000  $\mu\text{m}$  a 3000  $\mu\text{m}$ , mentre quello dei fasci secondari è compreso tra 150 e 1000  $\mu\text{m}$ . Il diametro di entrambi i tipi di fasci è direttamente correlato alle dimensioni macroscopiche e alle funzioni del tendine, cosicchè valori minori si osservano in tendini di piccole dimensioni (estensori e flessori delle dita), mentre diametri più elevati sono caratteristici di tendini di maggiori dimensioni come il tendine calcaneale, il tibiale anteriore e l'estensore lungo dell'alluce [75, 77].

In sezione trasversale i fasci primari o subfascicoli (il cui diametro è compreso tra 15 e 400  $\mu\text{m}$ ) mostrano generalmente un contorno triangolare con angoli piuttosto acuti; questa forma è

influenzata, ma non completamente determinata, dalla compressione esercitata dalle strutture circostanti e dal reciproco contatto con i fascicoli adiacenti.

Il numero di subfascicoli entro un fascicolo varia da tendine a tendine e talora anche nello stesso tendine; un fascicolo di solito risulta costituito da 3 o 4 subfascicoli sebbene Kastelic [81, 82] riporti che i fascicoli tendinei possano contenere fino a 10-12 subfascicoli.

Come per i subfascicoli, anche il numero di fibre collagene entro ogni fascio primario (subfascicolo) può variare considerevolmente da tendine a tendine.

### **CELLULE TENDINEE**

Le cellule tendinee provvedono a sintetizzare tutti i componenti della ECM, quindi il collagene, l'elastina, i proteoglicani e le glicoproteine strutturali. Le cellule tendinee, tenoblasti e tenociti, costituiscono circa il 90-95% degli elementi cellulari del tendine; il restante 5-10% comprende i condrociti presenti nei siti di inserzione e nelle zone fibrocartilaginee sottoposte a compressione, i sinoviociti delle guaine sinoviali e le cellule vascolari, come le cellule endoteliali dei capillari e le cellule muscolari lisce delle arteriole, contenuti nell'endotenonio e nell'epitenonio [80].

Il tendine giovane possiede un rapporto cellule/matrice molto elevato; le cellule (tenoblasti) sono disposte in lunghe filiere parallele [68] e appaiono di forma e dimensioni variabili; alcune sono allungate, altre arrotondate e altre ancora poligonali. La lunghezza dei tenoblasti varia da 20  $\mu\text{m}$  fino a 70  $\mu\text{m}$  e lo spessore da 8  $\mu\text{m}$  a 20  $\mu\text{m}$ . Caratteristica comune a tutti i tenoblasti è la presenza di numerosi prolungamenti citoplasmatici che si estendono nella matrice in tutte le direzioni. I suddetti processi provvedono a stabilire i contatti intercellulari ed infatti in loro corrispondenza si osservano gap junctions, tight junctions o giunzioni di tipo desmosomiale [77].

L'attività biosintetica delle cellule è elevata durante le prime fasi dell'accrescimento e si riduce man mano che il tendine raggiunge il proprio sviluppo definitivo; tuttavia l'attività può mutare drasticamente in una varietà di condizioni patologiche.

Il tessuto tendineo, come altri tessuti connettivi, va incontro a notevoli trasformazioni con l'età: si hanno modificazioni della morfologia cellulare con conseguenti modificazioni funzionali e modificazioni maturative della matrice. Si assiste infatti ad un progressivo declino del rapporto cellule/matrice che diviene bassissimo nel tessuto vecchio per un aumento notevole della matrice [80]. Le cellule ora chiamate tenociti diventano fusiformi ed estremamente allungate raggiungendo anche i 300  $\mu\text{m}$  di lunghezza. In sezione trasversale esse mostrano un notevole sviluppo dei prolungamenti citoplasmatici che diventano lunghissimi, conferendo ai tenociti la forma a “stella” o a “ragno” (fig. 7).

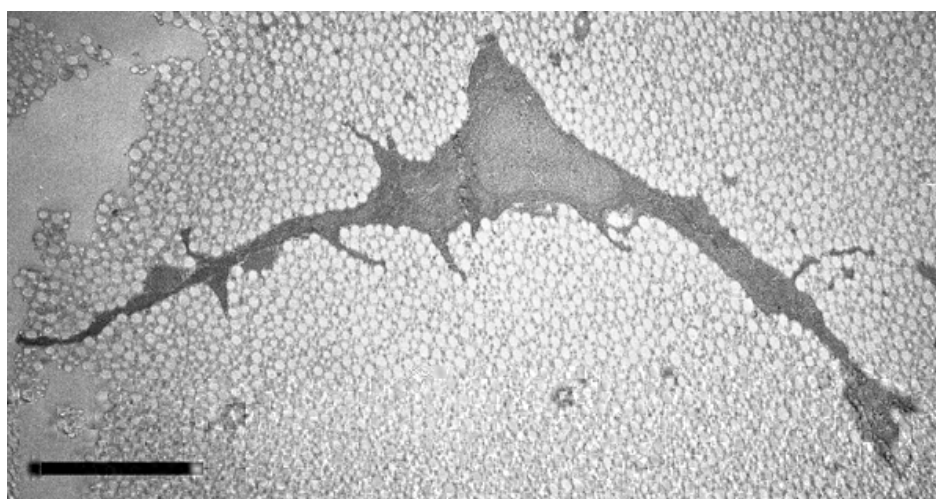


Figura 7: aspetto a “stella” o a “ragno” dei tenociti (TEM - barra della scala = 2,5  $\mu\text{m}$ )

Probabilmente la rete formata da questi prolungamenti è importante per assicurare gli scambi metabolici fra cellule e matrice in aree lontane dai corpi cellulari e provvede a compensare la riduzione numerica delle cellule a fronte dell'aumento di matrice che si determina con l'età.

I tenociti sono cellule metabolicamente attive ma la loro attività è comunque inferiore a quella dei tenoblasti, conservando comunque la capacità di sintetizzare tutti i componenti della ECM tendinea.

Le cellule tendinee non si limitano a sintetizzare le molecole di tropocollagene ma provvedono altresì a controllare le fasi iniziali della fibrillogenesi e ad influenzare l'orientamento e la deposizione delle fibrille neoformate in seno alla ECM. Recenti studi [19] condotti su tendini embrionali di pollo suggeriscono che la conversione del procollagene in tropocollagene, mediante clivaggio proteolitico dei propeptidi N- e C-terminali abbia luogo nel citoplasma cellulare all'interno del compartimento secretorio post-golgiano. In particolare la formazione delle fibrille inizierebbe già in sede intracellulare in quanto piccole fibrille collagene con un diametro costante di 28 nm e con un regolare periodo di 67 nm sono state osservate all'interno di carriers rivestiti da membrana noti come GPCs (Golgi to plasma membrane carriers) (fig. 8). Questi carriers, di forma tubulo-sacciforme si staccano dal compartimento trans del Golgi (TGN) e provvedono a trasportare il loro contenuto verso la membrana plasmatica [89, 151]. Secondo il modello proposto da Screen [138] la conversione del procollagene in tropocollagene avrebbe luogo proprio entro i GPCs probabilmente in seguito a fusione con vescicole contenenti le proteinasi richieste. All'interno dei GPCs inizierebbe quindi l'aggregazione del tropocollagene in segmenti fibrillari che agiscono da intermedi nella formazione delle fibrille definitive e gli stessi carriers provvederebbero a trasferire le fibrille neoformate o comunque in fase di assemblaggio a ridosso di peculiari protrusioni del plasmalemma che sono state indicate con il termine di "*fibripositors*" (fibril depositors). I *fibripositors* sono evaginazioni digitiformi della membrana orientate parallelamente al maggior asse tendineo aventi la funzione di depositare le fibrille neoformate nella ECM [19, 20] (fig. 8). Queste particolari specializzazioni della membrana posseggono un lume che si approfonda per parecchi microns all'interno del corpo cellulare; al centro del lume sono state osservate fibrille di diametro omogeneo che si estendono in modo continuo fin dentro un fascio di fibrille della ECM. Le estremità distali dei *fibripositors* si aprono entro peculiari canalicoli intercellulari di secrezione, ciascuno dei quali è costituito dall'affrontarsi di due docce scavate nelle membrane contigue di due cellule adiacenti [19, 20]. L'asse

longitudinale di questi canali, così come quello dei fibripositors, è sempre parallelo all'asse maggiore del tendine. Questi canali agiscono presumibilmente come guide per consentire il corretto ed ordinato allineamento e parallelismo delle fibrille neoformate rispetto all'asse tendineo.

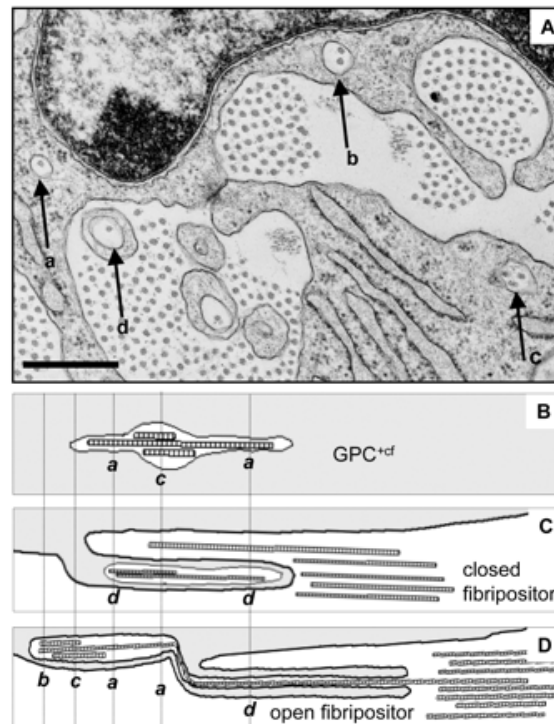


Figura 8: (A) TEM: fasci di fibrille collagene tra cellule adiacenti; nel citoplasma cellulare si notano inoltre fibrille contenute in vescicole rivestite da membrana corrispondenti ai GPCs (a, b, c); (B): rappresentazione schematica di un carrier (GPC) contenente alcune fibrille; (C-D): rappresentazione schematica di un fibripositor (d) rispettivamente chiuso (C) e aperto (D) contenente una fibrilla in fase di deposizione nella ECM. Lo stesso fibripositor (d) sezionato trasversalmente è mostrato in (A). [Canty EG and Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. J Cell Sci 2005]

In definitiva quindi le piccole fibrille neoformate vengono trasferite attraverso i GPCs tubulari alla porzione basale dei fibripositors, che poi provvedono a rilasciare le stesse entro i canalicoli intercellulari ove le fibrille si dispongono ordinatamente in piccoli fasci paralleli al principale asse tendineo.

I tenociti sono responsabili inoltre del turnover della matrice tendinea. Tuttavia le sedi anatomiche e i reali meccanismi che presiedono al catabolismo della matrice non sono completamente noti. In base a precedenti studi condotti su matrici di altri tessuti connettivali, due possibili meccanismi di degradazione appaiono plausibili: 1) i tenociti producono enzimi

lisosomiali o altri enzimi citosolici che vengono riversati nello spazio extracellulare dove quindi svolgono la loro attività catabolica; 2) i processi catabolici hanno luogo in sede intracellulare a seguito di fenomeni di fagocitosi e/o pinocitosi, così come avviene nel tessuto osseo ad opera degli osteoclasti [77].

E' noto che i tendini sono in grado di adattarsi a diverse condizioni di carico meccanico modificando la loro struttura, composizione e proprietà meccaniche, e che le cellule tendinee sono per prime responsabili di questa risposta adattiva [167]. La stimolazione meccanica delle cellule gioca infatti un ruolo di fondamentale importanza nel mantenimento dell'omeostasi tendinea; i tenociti devono essere capaci di rilevare le deformazioni della matrice extracellulare indotte dagli stress meccanici e tradurre poi queste informazioni in una risposta adattiva, ossia in un aumento o un decremento della produzione delle componenti della matrice stessa [48]. Ma in che modo le cellule tendinee utilizzano informazioni di tipo meccanico per regolare la sintesi e il turnover della ECM? E' noto [63, 65] che il citoscheletro cellulare è fisicamente e funzionalmente connesso alla ECM attraverso molecole di adesione localizzate nello spessore della membrana cellulare. Tra le diverse famiglie di molecole di adesione la più importante è quella rappresentata dalle integrine, che pur essendo coinvolte anche nell'adesione cellula-cellula, sembrano avere un ruolo di rilievo soprattutto nel mediare l'interazione tra le cellule e la matrice extracellulare. Le integrine sono recettori proteici di transmembrana costituiti da tre domini [63]:

- a) un dominio extracellulare, attraverso il quale le integrine interagiscono con svariati costituenti della ECM (collagene, PGs, glicoproteine strutturali come la fibronectina e la laminina)
- b) un dominio transmembrana
- c) un dominio citoplasmatico, che interagisce con proteine del citoscheletro quali talina,  $\alpha$ -actinina, vinculina e paxillina [87].

Le integrine trovandosi quindi in una posizione strategica appaiono come i candidati ideali per operare la trasduzione del segnale, ossia la traduzione dello stimolo meccanico applicato sulla superficie cellulare in un segnale di tipo biochimico. Le integrine stesse potrebbero quindi agire da meccanorecettori [64] e creare un “continuum” meccanico che consenta la trasmissione delle forze dall'esterno all'interno della cellula e/o viceversa [22, 48]. Lo stesso Ingber [65] sottolinea l'importante ruolo del citoscheletro nel processo di traduzione del segnale: secondo la teoria della tensegrità da lui proposta [66, 67], le forze esercitate dalla ECM sulle cellule sono in equilibrio con le forze esercitate dalle cellule stesse, in quanto a livello del citoscheletro sussiste una condizione di pre-stress, ossia il citoscheletro di per sé offre un certa resistenza alle forze meccaniche generate dall'esterno. Attraverso le integrine quindi, le deformazioni meccaniche della ECM si possono trasmettere direttamente al citoscheletro, innescando una complessa cascata di trasduzione del segnale che si traduce poi in un rimodellamento del citoscheletro e in modificazioni dell'espressione genica, della sintesi proteica e del differenziamento cellulare [166, 167].

### **INNERVAZIONE: organi tendinei del Golgi e stiramento muscolo-tendineo**

I tendini sono innervati da tronchi nervosi provenienti sia dal ventre muscolare sia dai rami sensitivi che si distribuiscono alla cute e ai connettivi profondi. I primi attraversano la giunzione muscolo-tendinea e continuano il loro decorso nei setti endotenonici. I secondi decorrono nel paratenonio e nel peritenonio ove formano un ricco plesso, i cui rami penetrano successivamente nei setti endotenonici ove si anastomizzano con i rami di provenienza muscolare.

Nel contesto del tendine i rami nervosi, che peraltro sono relativamente scarsi, formano una rete costituita da tronchi a decorso parallelo all'asse maggiore del tendine, anastomizzati da rami a decorso trasversale ed obliquo.



Le terminazioni di questi rami nervosi sono di vario tipo: alcune formano recettori corpuscolati come gli organi tendinei del Golgi (OTG), i corpuscoli del Pacini, del Ruffini e del Golgi-Mazzoni, altre si risolvono in arborizzazioni libere [112].

Gli OTG sono formazioni capsulate fusiformi site in corrispondenza della giunzione muscolo-tendinea disposte in serie rispetto alle fibre muscolari (fig. 9). La loro lunghezza varia da 800  $\mu\text{m}$  a 1200  $\mu\text{m}$  e la larghezza, a livello della porzione centrale da 30  $\mu\text{m}$  a 120  $\mu\text{m}$  [130]. Le fibre collagene del tendine penetrano nella capsula suddividendosi in piccoli fasci intrecciati, i fascicoli intrafusali, i quali appaiono costituiti da fibre di calibro minore rispetto a quelle presenti nel tendine.

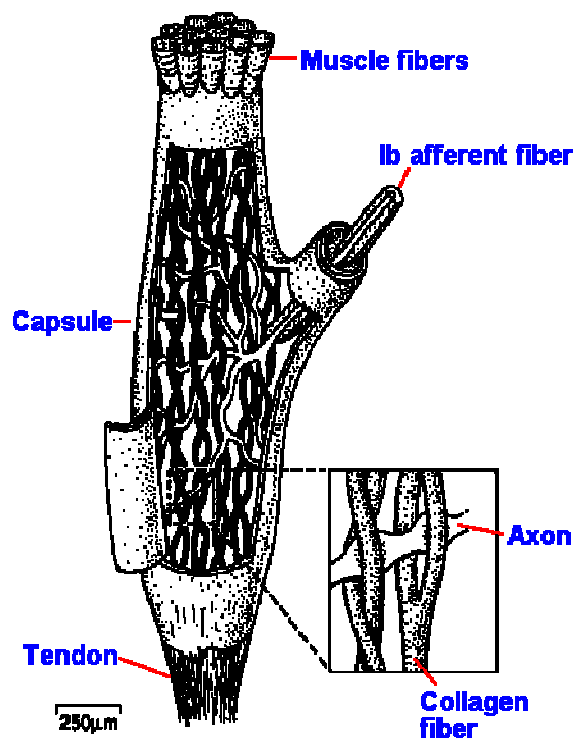


Figura 9: organo tendineo del Golgi

All'estremità opposta, rivolta verso il ventre muscolare, questi fascetti si riuniscono in uno o due fasci che, dopo aver perso il rivestimento capsulare si continuano con le fibre muscolari. Una o più fibre nervose del tipo I $\beta$  penetrano attraverso la capsula e dopo aver perduto la guaina mielinica si dividono in numerosi rami che si insinuano tra i fascicoli di collagene

avvolgendosi attorno ad essi e terminando in arborizzazioni libere [98, 99, 131] (fig. 9). Quando il muscolo si contrae, i fascetti vengono stirati e presumibilmente comprimono le terminazioni nervose interfascicolari, che agiscono pertanto da meccano-recettori, aumentando la loro frequenza di scarica [147, 148].

La funzione fisiologica degli OTG è quella di rispondere alle variazioni di tensione del tendine causate dalla contrazione muscolare, oppure da stiramenti di tipo passivo, come ad esempio durante lo stretching. Tuttavia occorre sottolineare che gli OTG risulterebbero essere maggiormente sensibili alle tensioni generate dalla contrazione muscolare piuttosto che dall'allungamento passivo del complesso muscolo-tendineo [60, 99, 147]; per questo motivo la loro funzione assume un ruolo molto rilevante in tutte quelle tecniche di stretching, come ad esempio la facilitazione propriocettiva neuromuscolare, che prevedano la contrazione del muscolo da allungare. E' bene ricordare inoltre che, per attivare gli OTG ed ottenere una risposta da questi ultimi, è necessario uno stretching particolarmente intenso. Gli OTG intervengono al fine di ridurre l'eccessiva tensione muscolare, attraverso un meccanismo che va sotto il nome di "inibizione autogenica" o di "riflesso miotatico inverso". Esso si esplica sia attraverso un'azione inibitoria nei confronti della muscolatura agonista e sinergica a quest'ultima che mediante una facilitazione della muscolatura antagonista [79, 99]. Durante questo compito gli OTG sono assistiti sia dai mecano-recettori articolari che da quelli cutanei. Lo scopo ultimo dell'inibizione autogenica espletata dagli OTG, è quello di esercitare una "funzione protettiva" nei confronti del complesso muscolo-tendineo. Quest'ultimo infatti potrebbe subire insulti traumatici nel caso in cui dovesse sopportare tensioni attive o passive eccessivamente elevate. Il processo opposto all'inibizione autogenica, viene definito con il termine di "disinibizione dei motoneuroni agonisti", e consiste nella minimizzazione o comunque nel ridimensionamento dell'azione inibitrice degli OTG. Questo tipo di meccanismo, come suggerito da alcuni Autori [17], potrebbe assumere una notevole rilevanza nell'ambito della massimalizzazione delle capacità di forza esplosiva e di forza massimale

dell'atleta. Le funzioni degli OTG non sono tuttavia del tutto chiare; alcuni aspetti particolari, come ad esempio il meccanismo di feedback inibitorio della contrazione muscolare nell'ambito della proprioccezione cosciente, dovranno essere ulteriormente approfonditi [70]. In ogni caso il riflesso miotatico inverso presenta importanti implicazioni nell'ambito dello stretching. Infatti, nel momento in cui un atleta mantiene una posizione di allungamento muscolare esercita una notevole tensione a livello dello stesso gruppo muscolare; se questa tensione fosse annullata, il soggetto potrebbe raggiungere posizioni di allungamento ancora maggiori. Utilizzando una metodica di stretching denominata "contrazione-rilassamento" è possibile indurre un rilassamento nella muscolatura coinvolta ottenendo così un maggior allungamento del muscolo e quindi del tendine. Se ad esempio si cerca di allungare un muscolo sino al punto in cui un suo ulteriore allungamento viene di fatto impedito dalla tensione esercitata sul muscolo stesso, un'ulteriore contrazione volontaria di quest'ultimo per un periodo compreso tra i 6 ed i 15 secondi induce gli OTG a promuovere il meccanismo di riflesso miotatico inverso, con l'effetto di consentire un ulteriore allungamento del muscolo, oltre il punto critico precedentemente raggiunto.

La funzione degli altri recettori corpuscolati presente nel tendine, analogamente agli OTG, è verosimilmente correlata alla sensibilità propriocettiva e ai riflessi miotatici [112, 143].

Le terminazioni nervose libere si trovano soprattutto nei foglietti peritendinei e ad essi è presumibilmente devoluto il ruolo di recettori per la sensibilità dolorifica.

### **I CRIMPS TENDINEI**

Le fibre e i fasci di fibre compresi nel tendine risultano allineati lungo la direzione di applicazione della forza applicata, essendo disposti cioè parallelamente al maggior asse tendineo. Tuttavia quando un tendine viene osservato al microscopio ottico le fibre ed i fasci di fibre non appaiono completamente rettilinei, ma mostrano un caratteristico andamento ondulato o a zig-zag come illustrato nella figura 10.

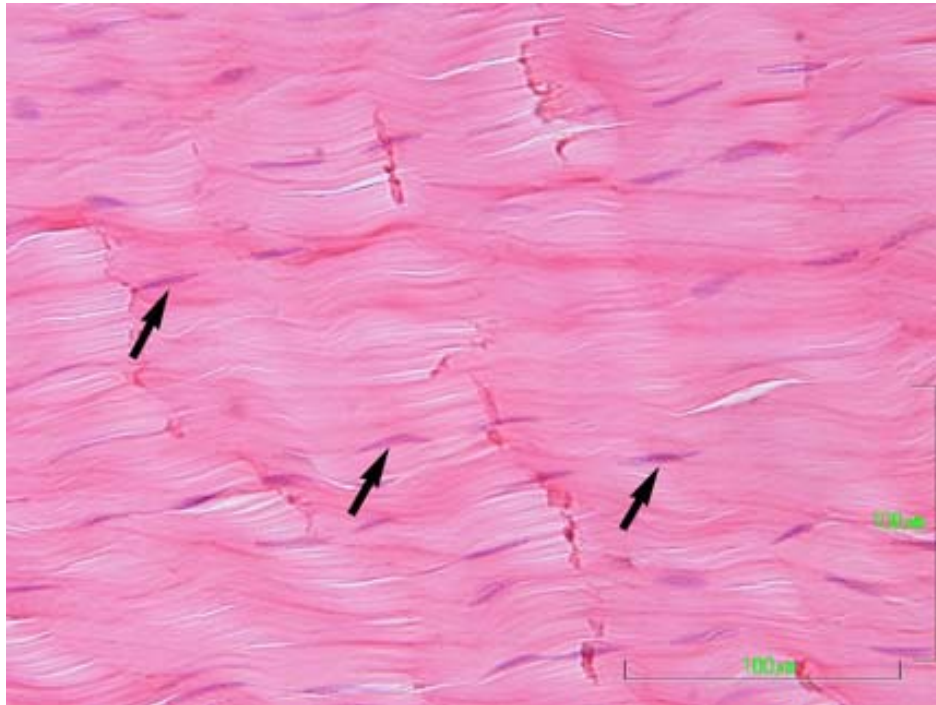


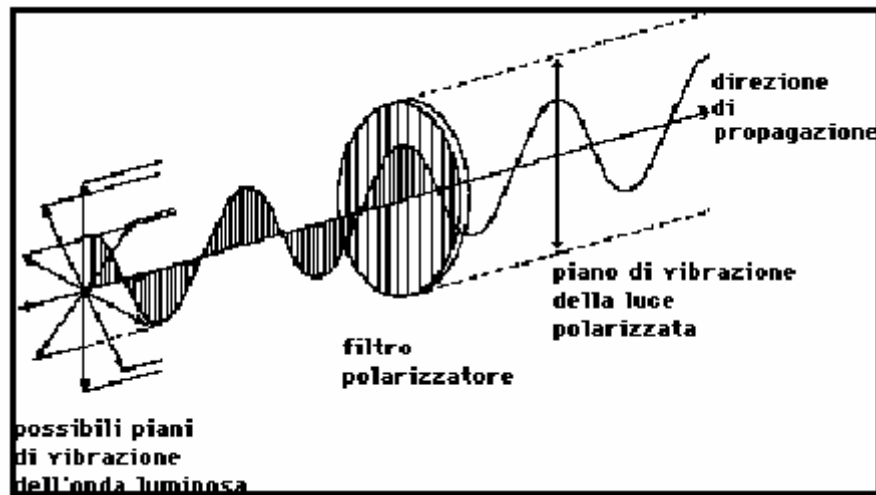
Figura 10: Tendine di Achille umano in sezione longitudinale: i fasci di fibre appaiono ondulati e tra questi si notano i tenociti (freccie) disposti in file parallele alla direzione dei fasci (Ematossilina-Eosina – barra della scala = 100  $\mu$ m).

In letteratura queste onde o pieghe sono state designate con i termini di wave-like structures o crimps [28, 29, 32, 50, 123, 124, 144, 155, 156]. L'aspetto ondulato delle fibre collagene nel tendine si può apprezzare al meglio quando il tessuto viene colorato con Sirius Red (colorante elettivo per il collagene) e successivamente osservato mediante il microscopio ottico a luce polarizzata; le fibre collagene infatti sono strutture anisotrope o birifrangenti avendo la capacità di modificare lo stato di polarizzazione della luce che le attraversa.

## **CENNI DI MICROSCOPIA OTTICA A LUCE POLARIZZATA**

### **Concetti generali**

Un raggio di luce è formato da onde, ciascuna delle quali oscilla in un piano detto piano di polarizzazione che è perpendicolare alla direzione di propagazione dell'onda stessa. In un raggio di luce normale le onde oscillano in tutti i possibili piani: per definizione esso non è polarizzato. Definiamo infatti polarizzato un raggio di luce formato da onde i cui piani di vibrazione sono tutti orientati in un'unica direzione, sono cioè paralleli fra loro.



Oltre che dal piano di polarizzazione, le onde luminose sono caratterizzate da uno stato di polarizzazione che può essere lineare, circolare o ellittico, e la definizione sarà così completa: è polarizzato un raggio di luce formato da onde con piani di polarizzazione paralleli fra loro e con uniforme stato di polarizzazione.

Alcune sostanze otticamente omogenee, trasparenti hanno le stesse proprietà ottiche in tutte le direzioni: il raggio di luce che le attraversa esce inalterato, eccetto che per l'eventuale cambiamento di direzione dovuto alle leggi della rifrazione. Queste sostanze sono dette isotrope, hanno cioè un solo indice di rifrazione (o asse ottico) e direzioni di simmetria non distinguibili le une dalle altre.

Altre sostanze hanno invece la capacità di modificare lo stato di polarizzazione della luce che le attraversa, e per tale motivo vengono dette anisotrope o birfrangenti.

### **Il concetto di birifrangenza e la sua dimostrazione**

Si definiscono “isotropi” gli oggetti in cui l'indice di rifrazione e l'assorbimento della luce sono uguali per tutti gli assi di provenienza della luce.

Si definiscono “anisotropi” gli oggetti in cui l'indice di rifrazione e l'assorbimento della luce variano a seconda della direzione da cui l'oggetto è illuminato.

Se un oggetto birfrangente viene illuminato con luce polarizzata che ha sia direzione di propagazione che piano di propagazione idoneamente orientati rispetto all'oggetto stesso, la

radiazione luminosa incidente viene scomposta in due radiazioni, entrambe polarizzate, che vibrano su piani tra loro ortogonali e che procedono con velocità diversa tra loro. Dalla differente velocità di propagazione deriva il termine birifrangenza: l'indice di rifrazione di un mezzo è inversamente proporzionale alla velocità della luce in quel mezzo.

La birifrangenza è data dall'orientamento di unità elementari di ordine di grandezza assai inferiore al limite di risoluzione del microscopio ottico.

Le fibre collagene posseggono una “birifrangenza intrinseca” che è determinata dall'ordinato orientamento laterale e assiale delle molecole di collagene ed inoltre una “birifrangenza di forma” che invece dipende dalla geometria o forma delle molecole, simile ad un bastoncino nel caso del collagene [27, 29]. Dal momento che le fibre collagene sono costituite da fasci di fibrille, i due tipi di birifrangenza dipendono inoltre dal diametro delle fibrille e dal grado di impacchettamento delle stesse [21].

Nelle strutture birifrangenti di interesse biologico esiste un asse, tale che se la luce incide su di esse non si ha birifrangenza; si considera questo asse come asse ottico di riferimento e si definisce la birifrangenza “uniassiale”.

La birifrangenza si evidenzia in massimo grado quando l'asse di riferimento della struttura è perpendicolare alla direzione di propagazione della luce. Essa è rilevabile dall'osservazione con il microscopio a luce polarizzata, poiché le strutture birifrangenti, illuminate perpendicolarmente all'asse di riferimento, appaiono luminose, sul fondo scuro.

Le strutture birifrangenti quando vengono illuminate parallelamente all'asse di riferimento non sono invece visibili perché rimangono non luminose, cioè buie, come il fondo.

L'esperienza dimostra che la luminosità è massima allorché l'asse di riferimento della struttura forma un angolo di  $45^\circ$  con il piano di polarizzazione della luce incidente, mentre la struttura stessa appare nera (estinzione) se il suo asse di riferimento è parallelo o perpendicolare a tale piano di polarizzazione.

Questo comportamento è comprensibile se si considera che la luce, incidente con il piano di polarizzazione obliquo rispetto all'asse di riferimento, viene scomposta in due radiazioni, una polarizzata su un piano parallelo all'asse di riferimento (raggio straordinario, con indice di rifrazione  $n_s$ ), l'altra polarizzata su un piano perpendicolare all'asse di riferimento (raggio ordinario, con indice di rifrazione  $n_o$ , uguale a quello della struttura colpita dalla luce parallelamente all'asse di riferimento).

L'ampiezza della due radiazioni è desumibile da quella della radiazione incidente e dall'angolo tra il piano di polarizzazione della luce incidente e l'asse di riferimento della struttura, seguendo la regola del parallelogramma (l'ampiezza della radiazione incidente sta a quella di ciascuna delle due radiazioni emergenti come la diagonale di un parallelogramma, che abbia i lati orientati secondo i piani di polarizzazione delle radiazioni emergenti, sta a ciascuno dei lati; la lunghezza della diagonale rappresenta, graficamente, l'ampiezza della radiazione incidente e la sua direzione il piano di polarizzazione della medesima). Con la stessa regola si può calcolare quanto di ciascuna radiazione viene trasmesso attraverso l'analizzatore; quando l'asse di riferimento della struttura è parallelo, o perpendicolare, al piano di polarizzazione della luce incidente non si avrà birifrangenza; questa apparirà per posizioni oblique e la quota di intensità luminosa trasmissibile attraverso l'analizzatore risulterà massima, pari cioè a quella della radiazione incidente, quando il piano di polarizzazione della luce incidente è a  $45^\circ$  rispetto all'asse di riferimento della struttura.

Nell'esame a luce polarizzata si utilizzano tavolini traslatori rotabili rispetto all'asse ottico per determinare gli assi lungo i quali vibrano il raggio straordinario e quello ordinario.

### **Il valore della birifrangenza e la sua determinazione**

Le due radiazioni che emergono da una struttura birifrangente sono sfasate tra loro a causa della diversa velocità di trasmissione all'interno della struttura medesima. Lo sfasamento tra i due raggi, o ritardazione, dipende oltre che dalla differenza tra gli indici di rifrazione anche

dallo spessore della struttura. La differenza da il valore della birifrangenza; questa sarà positiva o negativa a seconda che  $n_s$  sia rispettivamente maggiore o minore di  $n_o$ .

La sfasatura o ritardo d'onda, indotta tra i due raggi dalla rispettiva differenza dei rispettivi indici di rifrazione, permette fenomeni di interferenza; inoltre, per ciascuno dei due raggi, l'indice di rifrazione varia con la lunghezza d'onda della luce. L'interferenza tra i due raggi, nell'osservazione a polarizzatori incrociati, si può quindi tradurre in differenze cromatiche dell'immagine osservata, a seconda dello spessore della struttura esaminata.

Gli oggetti birifrangenti o "anisotropi" possiedono per lo più due indici di rifrazione diversi e perpendicolari tra loro e il raggio di luce che li attraversa viene suddiviso in due componenti polarizzate oscillanti in piani perpendicolari fra loro, secondo la direzione degli indici di rifrazione.

Quando un oggetto anisotropo è orientato in modo che uno dei due indici giace o è parallelo al piano di vibrazione della luce polarizzata, la componente di vibrazione della luce polarizzata dovuta a questo indice è massima, mentre quella dovuta all'altro indice è nulla: in questa posizione l'oggetto anisotropo sembra possedere un solo indice di rifrazione. Ruotando l'oggetto in esame di  $90^\circ$ ,  $180^\circ$ ,  $270^\circ$  rispetto alla posizione iniziale si avranno variazioni nei ritardi d'onda visibili come effetti di sovrapposizione di colori.

La luce normale può essere trasformata in luce polarizzata facendola passare attraverso particolari elementi ottici filtranti: si tratta di prismi polarizzatori, il più noto dei quali è il prisma di Nicol risalente al 1828, che si ottengono da un romboedro di sfaldatura di calcite tagliato opportunamente in due parti che poi vengono cementate fra loro con balsamo del Canada.

Oggi si hanno a disposizione particolari filtri ottici: i polarizzatori, caratterizzati dall'avere un unico piano di vibrazione attraverso cui può passare la luce. L'effetto del polarizzatore sulla luce normale che lo attraversa è quello di suddividerla in due componenti polarizzate: onde



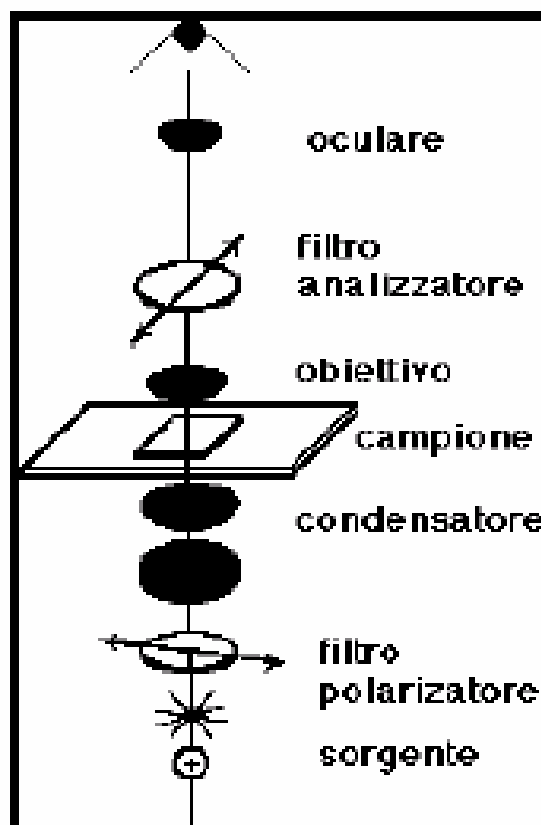
che vibrano parallelamente al piano di polarizzazione del filtro e che saranno trasmesse, e onde perpendicolari ad esso che saranno otticamente eliminate.

I filtri polarizzatori polaroid, in vetro o plastica, si comportano come il prisma di Nicol trasmettendo cioè un solo raggio di luce polarizzata.

Un importante vantaggio nell'uso dei filtri rispetto ai prismi sta nel fatto che permettono di non ridurre l'apertura utile del condensatore anche se un'elevata intensità luminosa li può danneggiare.

### **Il microscopio polarizzatore**

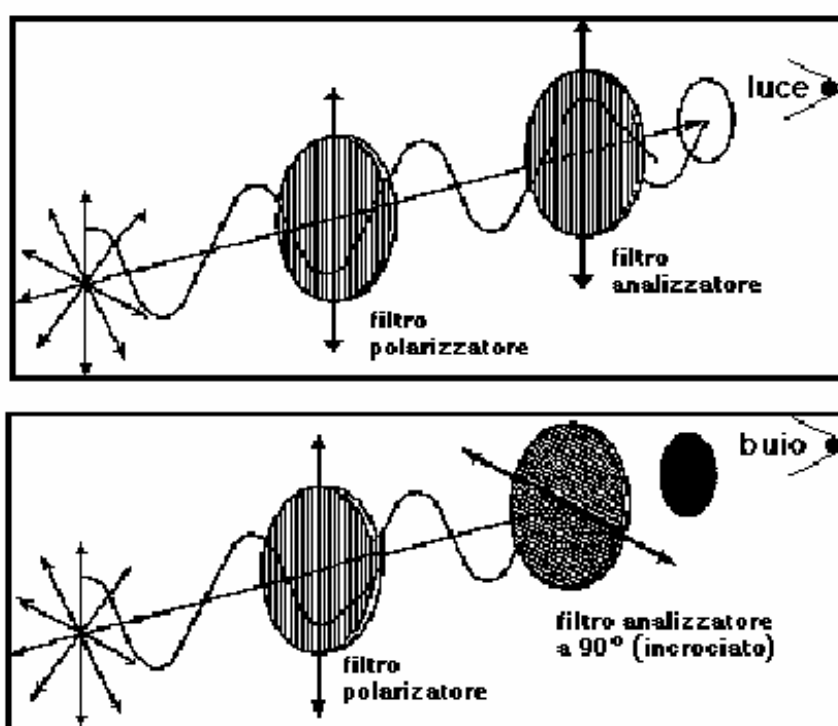
Il microscopio polarizzatore può essere un normale microscopio provvisto di due filtri polarizzatori neutri; il filtro posto tra l'oculare e l'obiettivo viene definito “analizzatore”, mentre il filtro posto tra la fonte di luce e l'oggetto viene definito “polarizzatore”.



Le caratteristiche dell'oggetto in esame, posto fra i due filtri e attraversato dalla luce polarizzata, vengono studiate ruotando i filtri polarizzatori “polaroid” l'uno rispetto all'altro, oppure ruotando l'oggetto posto fra di essi.

Ambedue i filtri sono montati in alloggiamenti girevoli, in modo che è possibile l'esatta rotazione dell'uno rispetto all'altro. L'oggetto da esaminare è quindi posto tra di essi ed è attraversato dalla luce polarizzata.

Quando i due filtri polarizzatori sono in posizione "incrociata" (sono cioè con i piani di polarizzazione rispettivamente perpendicolari) il campo del microscopio è scuro e il fascio di luce, polarizzato dal primo filtro, viene fermato dal secondo.



Se l'oggetto attraversato da luce polarizzata ha la proprietà di influire sul suo stato di polarizzazione, è cioè anisotropo, allora il piano di polarizzazione della luce che ha superato il campione ruota e l'oggetto sarà visto come luminoso e colorato su un fondo scuro (nero).

I colori variabili di polarizzazione (o di interferenza) osservabili nel tendine dipendono dalle differenze di spessore e dal diverso grado di impacchettamento dei fasci di fibre collagene; tipicamente le regioni tendinee contenenti fasci più sottili e meno compatti mostrano un colore di interferenza verde, mentre i fasci più spessi appaiono di un colore giallo brillante o rosso [78].

Quando un tendine viene osservato al microscopio ottico a luce polarizzata, esso mostra una periodica alternanza di bande chiare e scure [28, 29, 32, 50, 155, 156]; più nettamente visibile quando il suo asse giace parallelamente o perpendicolarmente al piano di polarizzazione della luce. Questo bandeggio si produce non già perché nel tendine si susseguono periodicamente aree birifrangenti e non birifrangenti, ma perché i fasci di fibre mostrano una periodica variazione di orientamento rispetto all'asse longitudinale del tendine stesso [33, 49, 50].

Tipicamente la massima luminosità si osserva allorché l'asse di riferimento della struttura (tendine) forma un angolo di  $45^\circ$  con il piano di polarizzazione della luce incidente, mentre la struttura stessa appare nera (estinzione) se il suo asse di riferimento è parallelo o perpendicolare a tale piano di polarizzazione [29, 32, 50]. Pertanto le bande scure corrispondono a zone di estinzione nelle quali le fibre o i fasci di fibre cambiano repentinamente direzione.

Ruotando il campione rispetto al polarizzatore ed esaminando come varia il pattern delle bande di estinzione si possono avere informazioni circa l'orientamento e la direzione dei fasci di fibre [50]. Infatti quando il tendine viene ruotato rispetto al polarizzatore (ruotando cioè il tavolino porta oggetto) le bande di estinzione si spostano, muovendosi continuamente lungo il tendine. Quando l'angolo di rotazione  $\theta$  del campione rispetto al polarizzatore è pari a zero e l'asse del tendine è parallelo ad uno dei due polarizzatori le linee di estinzione appaiono sottili ed equidistanti: esse allora corrispondono alle creste e ai valli del crimp tendineo. Ruotando il campione a partire da questa posizione, in senso orario o antiorario, il pattern delle bande si modifica; compaiono infatti coppie alternate di bande di estinzione le quali si fondono poi in un'unica banda quando  $\theta$  coincide con l'angolo del crimp ( $\theta_0$ ). Continuando a ruotare si nota che le bande di estinzione si assottigliano fino a scomparire del tutto per un angolo  $\theta=45^\circ$ ; in questa posizione il tendine trasmette la luce in modo uniforme ed appare completamente brillante. Se a questo punto il campione viene ulteriormente ruotato le bande di estinzione ricompaiono, ma in una sequenza esattamente speculare a quanto visto precedentemente fino a

quando, raggiunto un angolo  $\theta=180^\circ$ , le sottili linee di estinzione vengono nuovamente a coincidere con gli apici dei crimps.

Utilizzando questo approccio Viidik [155, 156] ha esaminato tendini sottoposti a stiramento in vitro, dimostrando che, con l'aumentare della tensione applicata, le bande di estinzione scompaiono gradualmente fino ad annullarsi completamente, in quanto i fasci di fibre progressivamente si distendono. Lo stiramento induce infatti un aumento della birifrangenza intrinseca, poiché l'allineamento dei fasci di fibre nella direzione della forza applicata si traduce in un aumentato ordine strutturale. In definitiva quindi esiste una stretta corrispondenza tra struttura dei crimps tendinei, deformazione e carico tensile [50]. Nel modello proposto da Diamant [32] i crimps tendinei vengono descritti come onde di forma triangolare con un arrangiamento planare rispetto all'asse della struttura tendinea (fig. 11). Nel crimp si possono individuare due parametri salienti: l'angolo  $\theta$  e il periodo  $2l$ , quest'ultimo pari alla distanza tra i due picchi dell'onda.

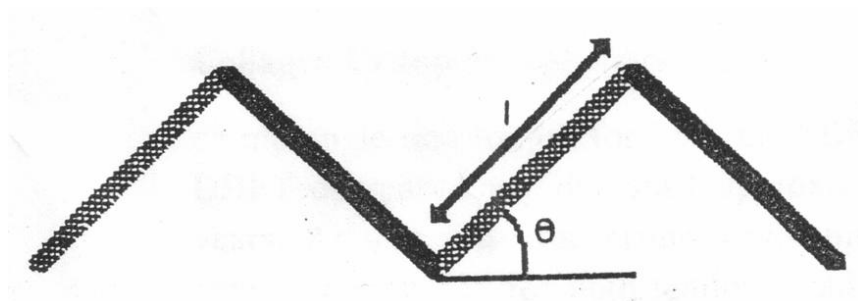


Figura 11: Modello di crimp secondo Diamant (1972);  $l$  e  $\theta$  rappresentano rispettivamente la lunghezza (pari a mezzo periodo) e l'angolo del crimp.

Studi in vitro [32, 155, 156] dimostrano che entrambi questi parametri si modificano durante lo stiramento: il periodo aumenta mentre l'angolo diminuisce in quanto la struttura ondulata a zig-zag progressivamente si distende fino ad estinguersi completamente per un dato carico critico applicato.

Diversi autori [32, 49, 50, 109, 110] hanno inoltre evidenziato che l'aspetto dei crimps si modifica con l'età: la lunghezza del crimp (corrispondente a mezzo periodo) aumenta, mentre l'angolo  $\theta$  diminuisce con l'età. Da studi condotti sul tendine della coda di ratto si evince che

la lunghezza cessa di aumentare quando l'animale raggiunge la maturità (3 mesi), mentre l'angolo  $\theta$  continua a diminuire per tutto il resto della vita. Il numero di crimps in ogni fibra invece rimane costante per tutta la vita [32]. La lunghezza del crimp resta proporzionale alla lunghezza della coda per tutta la vita, in quanto ogni crimp si allunga in modo proporzionale alla crescita della coda. Queste modificazioni età-dipendenti nella struttura dei crimps rendono conto delle diverse prestazioni meccaniche che i tendini sono in grado di offrire nelle diverse fasi della vita: tipicamente i tendini giovani mostrano una maggiore compliance ed estensibilità rispetto a quelli più anziani ed inoltre la deformazione percentuale richiesta per determinare la estinzione dei crimps è considerevolmente maggiore negli animali giovani [32, 50, 81].

Come altre caratteristiche del tendine, anche l'angolo dei crimps sembra essere strettamente correlato alla funzione che i tendini devono svolgere in rapporto all'azione specifica dei muscoli dai quali dipendono [90, 110, 122, 172]: in accordo alla relazione “la forma è conseguenza della funzione” [171], quanto maggiore è il carico cui è sottoposto un tendine, tanto maggiore è l'angolo del crimp e viceversa [90, 110, 122]. L'angolo del crimp delle fibre collagene tende ad essere maggiore nei tendini che lavorano contro la forza di gravità e che sono quindi soggetti ad elevate deformazioni tensili, come nel tendine di Achille e del quadricipite; i tendini soggetti a carichi meccanici più lievi ma che svolgono funzioni di elevata specificità e precisione, come quello dell'estensore lungo del pollice, sono costituiti da fibre più sottili con un angolo minore [71].

Alla luce dell'importante relazione esistente tra crimps tendinei e comportamento meccanico del tendine, numerosi studi sono stati realizzati allo scopo di stabilire quando e in che modo il crimping venga introdotto nelle fibre collagene durante lo sviluppo del tendine. Diversi autori [50, 140, 141] ipotizzano un coinvolgimento diretto dei tenoblasti nella formazione dei crimps: nei tendini embrionali di pollo durante la fibrillogenesi inizialmente le cellule tendinee appaiono disposte ad entrambe le estremità delle fibrille in via di assemblaggio;

successivamente, mano a mano che le fibrille vanno incontro a condensazione laterale, i tenoblasti si allineano e si dispongono in file longitudinali parallele strettamente ravvicinate tra le quali si vengono a trovare interposte le fibrille in formazione. E' stato ipotizzato che il crimp venga introdotto nei fascetti di fibrille o in seguito ad attiva contrazione delle cellule poste alle estremità delle fibrille o attraverso stress di taglio introdotti dalle cellule tra gli strati di fibrille [140, 141]. Tuttavia il crimping delle fibre collagene potrebbe altresì essere il risultato di una contrazione volumetrica della matrice; una riduzione del contenuto in proteoglicani e quindi in acqua provocherebbe una coartazione della matrice con conseguente piegamento delle fibre [25].

### **I CRIMPS E IL COMPORTAMENTO MECCANICO DEL TENDINE**

Come i materiali inerti, anche la materia vivente possiede delle proprietà fisiche elementari che si manifestano sotto l'azione di sollecitazioni meccaniche. Per "comportamento meccanico" si intendono le modalità con le quali un materiale si deforma e raggiunge la rottura quando venga assoggettato ad azioni esterne. Descrizione completa e sintetica di tale comportamento si ottiene con il diagramma carico-deformazione (stress-strain), un grafico che riporta per ogni valore della sollecitazione applicata la relativa deformazione percentuale. Lo studio del comportamento meccanico dei materiali si semplifica notevolmente quando esso venga visto come la sovrapposizione di tre distinti comportamenti fondamentali dei quali si può dare una precisa definizione matematica. I tre comportamenti fondamentali sono:

- a) **elasticità**, la tendenza di un materiale a deformarsi in maniera proporzionale ai carichi applicati e ad assumere le medesime condizioni iniziali una volta cessata la forza deformante;
- b) **plasticità**: un materiale si dice plastico quando, sottoposto ad una sollecitazione meccanica, non subisce alcuna deformazione finchè la sollecitazione meccanica non

raggiunge un determinato valore che prende il nome di carico limite. Al di là di esso la deformazione prosegue indefinitivamente finché la sollecitazione non viene rimossa;

- c) **viscosità**: un materiale ha comportamento viscoso quando esiste proporzionalità tra la velocità di deformazione del materiale e la forza applicata. Mentre nel comportamento elastico la deformazione è proporzionale alla forza, nel comportamento viscoso la deformazione risulta proporzionale non solo alla forza, ma anche al tempo in cui essa viene applicata.

Generalmente i materiali biologici posseggono delle caratteristiche biomeccaniche che risultano dalla combinazione delle proprietà meccaniche elementari prima descritte. Così il tessuto tendineo possiede caratteristiche di elasticità, plasticità e viscosità.

Il ruolo svolto dalle componenti macromolecolari del tessuto tendineo sulla elasticità, plasticità e viscosità del tendine non è stato completamente chiarito. Come è noto il collagene e l'elastina formano le strutture fibrillari del tendine, mentre i proteoglicani e le glicoproteine ne costituiscono la sostanza amorfa. Queste diverse componenti formano un'unità funzionale in cui però ciascuna di esse gioca un ruolo preminente nel determinare un aspetto particolare del comportamento biomeccanico complessivo del tessuto.

Partington e Wood [108], digerendo il tendine con ialuronidasi (enzima che degrada la componente glicosaminoglicanica dei proteoglicani), hanno osservato che dopo il trattamento enzimatico il tessuto tendineo mostrava un comportamento più elastico. Anche Jackson aveva precedentemente notato dopo trattamento con ialuronidasi una diminuzione della stabilità del tessuto tendineo, come dimostrava l' aumentata solubilità del collagene in acido acetico diluito e una diminuzione della retrazione termica del tendine [69]. Minns e collaboratori hanno invece trattato tendini umani con  $\alpha$ -amilasi ed EDTA [90]; entrambe queste sostanze attaccano la matrice tendinea interfibrillare di natura glicoproteica, permettendo la dispersione delle fibre collagene in acido acetico diluito. Dopo il trattamento con  $\alpha$ -amilasi o EDTA il tendine mostra una diminuzione dell' entità del carico in grado di provocare la deformazione

iniziale ed un abbassamento della curva tensione-deformazione. Da questi dati si può dedurre che i proteoglicani e le glicoproteine esercitano particolare influenza sulla viscosità del tendine e che, in particolare, la loro degradazione con metodiche enzimatiche provoca una diminuzione della viscosità del tessuto. D'altra parte l'abbassamento della curva tensione-deformazione osservato dopo trattamento con  $\alpha$ -amilasi e l'aumento di dell'elasticità del tendine osservato dopo trattamento con ialuronidasi, farebbero pensare che i proteoglicani e le glicoproteine influenzino anche la plasticità del tendine. Probabilmente la estrazione del materiale glicoproteico determina una riduzione del numero dei legami chimici pesenti tra le fibrille collagene facendo diminuire la plasticità del tessuto. La plasticità del tendine è determinata principalmente dal collagene; la rigidità del tessuto tendineo è infatti direttamente proporzionale al contenuto assoluto di collagene ed alla quantità di legami intra- ed intermolecolari della proteina fibrosa. I tendini di soggetti giovani in cui il contenuto di collagene e lo stato di aggregazione della proteina sono più bassi hanno infatti un comportamento più elastico e meno plastico di quello dei tendini di soggetti adulti.

L'elasticità è invece controllata principalmente dalle fibre elastiche. Il contenuto relativamente scarso di fibre elastiche del tendine, se rapportato al numero di fibre collagene, spiega perchè il decorso della curva tensione-deformazione del tendine sia così ripido se paragonato a quello di tessuti più ricchi di elastina, come ad esempio il legamento nucale ed i legamenti gialli.

### **Curva tensione-deformazione del tendine**

Quando un tendine è assoggettato ad una forza tensile, esso subisce dapprima un allungamento iniziale pari all' 1-3% circa della sua lunghezza originaria. Successivamente il tessuto tendineo mostra una notevole rigidità per aumenti anche notevoli della forza applicata. Per carichi ancora più elevati si ha un maggior incremento dell'entità della deformazione che porta infine alla rottura del tendine. Il carico di rottura è stato variamente calcolato. Esso oscilla da 3 a 4.5 Kg/mm<sup>2</sup> con una percentuale di allungamento del 14-18% in campioni



prelevati da animali o da esseri umani molto giovani. Per tendini prelevati da soggetti adulti invece, il carico di rottura oscilla tra i 4.3 e gli 11.5 Kg/mm<sup>2</sup> con una percentuale di allungamento del 10-12.5%. I tendini degli individui giovani sono quindi più deboli ma più elastici di quelli degli adulti. Ciò può essere dovuto alla diversa struttura chimico-fisica dell'impalcatura collagenica, alle variazioni qualitative e quantitative che subiscono le fibre elastiche con l'età, alla diminuzione dei proteoglicani e del conseguente stato di idratazione del tessuto e ad altre variabili biochimiche e istologiche precedentemente descritte.

Interessanti considerazioni possono essere tratte dalla curva tensione-deformazione del tendine che viene tradizionalmente suddivisa in tre regioni: **una prima parte** (toe region) non lineare nella quale il tendine viene stirato facilmente, ossia la forza richiesta per indurre la deformazione è molto modesta; **una seconda parte** con decorso ripido che mette in evidenza la plasticità del tessuto tendineo: in questa fase per aumenti anche notevoli delle sollecitazioni tensorie, il tendine subisce solo modiche deformazioni. Infine nella **terza parte** della curva si assiste al cedimento finale del tessuto tendineo che termina con la rottura del campione. La rottura sopraggiunge probabilmente quando vengono rotti i legami covalenti intra- ed intermolecolari del collagene con conseguente defibrillazione (fig. 12).

## Tendon stress/strain curve

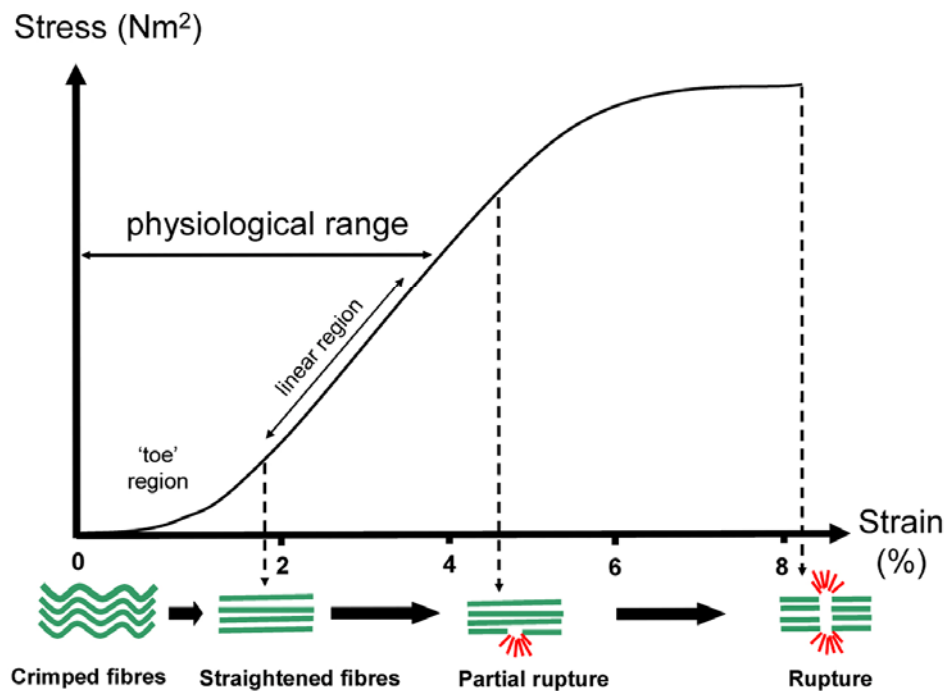


Figura 12: curva tensione-deformazione del tendine

Il comportamento meccanico del tendine nella toe region (per piccole deformazioni) è determinato dall'andamento ondulato a zig-zag dei fasci di fibre nella condizione rilassata, ossia dalla presenza dei crimps. Già nel 1959 Rigby e collaboratori osservarono variazioni dell'aspetto istologico del tendine durante le distensione e dimostrarono che applicando al tendine una graduale sollecitazione tensoria, l'ondulazione dei fasci tendeva a scomparire [118]. Questa prima parte della curva corrisponde quindi alla distensione dei crimps tendinei visibili in microscopia ottica a luce polarizzata [32] e pertanto al progressivo reclutamento e nuovo orientamento dei fasci di fibre che si allineano nella direzione di applicazione del carico [4]. Quando un tendine viene stirato a velocità costante si produce tipicamente un aumento della birifrangenza intrinseca del tessuto perchè per effetto della forza tensoria applicata il crimp tendineo si trasforma gradualmente in una struttura tensile puramente

rettilinea con conseguente aumento del grado di allineamento e di orientamento dei fasci di fibre.

Alla regione iniziale non-lineare o toe region segue una regione pressoché lineare più rigida, caratterizzata da un improvviso aumento della pendenza della curva; al crescere del carico infatti, la rigidità del tessuto aumenta, in quanto la forza deformante viene applicata su fibre collagene ormai distese che oppongono quindi una resistenza crescente alla trazione [81, 83] e pertanto è richiesta una forza progressivamente maggiore per produrre un allungamento specifico d'egual valore. In questa fase non è possibile apprezzare ulteriori modificazioni strutturali a livello microscopico, pertanto l'ulteriore deformazione del tendine si produce attraverso modificazioni che interessano i livelli submicroscopici della gerarchia strutturale tendinea, ossia le fibrille e le singole molecole collageniche [45, 137, 138].

Per grandi allungamenti specifici, la curva carico-deformazione può interrompersi bruscamente o puntare verso il basso come risultato di cambiamenti irreversibili nella struttura del tessuto. Quando la curva assume andamento parallelo all'asse dell'allungamento percentuale, il corrispondente valore del carico è indicato con  $P_{lin}$ . Il punto in corrispondenza del quale si raggiunge tale carico è il punto di plasticizzazione del tessuto. Una volta che sia stata superata la regione lineare il collasso della struttura tendinea avviene in modo imprevedibile e con il raggiungimento del carico massimo che riflette la resistenza ultima a trazione, il collasso completo si manifesta rapidamente e la capacità del tendine di sostenere carichi è sostanzialmente ridotta.

Nella toe region il tendine si comporta in maniera elastica perché al cessare della sollecitazione meccanica esso riprende la lunghezza originale. Il comportamento del tendine in questa fase iniziale non lineare è stato attribuito come si è detto alla graduale distensione dei crimps tendinei, i quali in risposta alla forza applicata si appiattiscono fino ad estinguersi completamente quando la deformazione del tendine raggiunge un valore pari al 4%. I crimps tendinei non scompaiono simultaneamente, ma gradualmente: vi è un progressivo

reclutamento e distensione dei fasci che procede dalle estremità verso la porzione centrale del tendine [55, 155]. Pertanto al termine della toe region i fasci risultano completamente allineati nella direzione di applicazione del carico stesso. L'ampiezza della toe region sembra quindi dipendere dalla struttura e dalle caratteristiche morfologiche dei crimps, che a loro volta sono correlate alla specifica funzione del tendine. Ad esempio alcuni tendini, come il tendine della coda di ratto, presentano una toe region più stretta (di circa l' 1-2%) se comparati ad alcuni tendini di flessori dell'uomo, come il tendine di Achille (5%) [55, 76]. Fino a deformazioni del 4% circa della sua lunghezza, il tendine manifesta un comportamento elastico, in quanto al cessare della forza deformante i crimps si ricostituiscono restituendo al tendine la struttura istologica a fasci di fibre a decorso ondulato a zig-zag. Quando la deformazione supera il 4% della lunghezza originaria i crimps non si ricostituiscono più, perchè verosimilmente si producono delle modificazioni plastiche di tipo semi-permanente [32]. Tuttavia in condizioni fisiologiche i tendini vengono sollecitati per non più di un quarto del valore del loro carico di rottura; il limite superiore per la deformazione fisiologica nei diversi tendini è da 2 al 5%. Durante la normale contrazione muscolare la deformazione del tendine non eccede mai il suddetto limite del 4% [77, 91] pertanto i carichi fisiologici del tendine sembrano cadere appunto in questa prima parte della curva e quindi l'allungamento che il tendine subisce durante i normali movimenti muscolari si realizza in gran parte attraverso la distensione dei crimps [77, 157].

La seconda parte della curva con decorso ripido e praticamente lineare mette in evidenza la plasticità del tessuto tendineo. Infatti, per aumenti anche notevoli delle sollecitazioni tensorie, il tendine subisce solo modiche deformazioni. In questa fase i crimps tendinei risultano completamente estinti e lo stiramento si produce quindi a carico dei fasci di fibre distesi e allineati nella direzione del carico. L'ulteriore deformazione che il tendine subisce nella regione lineare sarebbe quindi a carico di altri componenti della scala gerarchica tendinea: in particolare secondo Fratzl [45] verosimilmente si produce stiramento delle singole molecole

collageniche e dei legami intermolecolari con conseguente slittamento longitudinale delle molecole di collagene adiacenti all'interno delle fibrille. Il D-period di 67 nm è rigidamente costante nei tendini rilassati, tuttavia misurazioni realizzate con l'ausilio della microscopia elettronica a trasmissione e della diffrazione ai raggi X hanno evidenziato un aumento significativo della lunghezza del periodo delle fibrille collagene in tendini sottoposti a stiramento meccanico in vitro [43, 45, 155]. Mosler [101] ha evidenziato che lo stiramento induce un incremento del periodo fibrillare che si produce sia attraverso lo stiramento delle singole molecole collagene sia attraverso un riarrangiamento molecolare, ossia uno slittamento longitudinale delle molecole con conseguente incremento dell'ampiezza delle gap regions. Durante l'applicazione di un carico meccanico le molecole collagene, le fibrille e i fasci di fibrille si deformano progressivamente fino a quando subentra la rottura attraverso un processo definito defibrillazione [43, 127, 128, 149]. L'esatto meccanismo attraverso il quale l'energia meccanica viene convertita in deformazione molecolare e fibrillare non è ancora chiaro; tuttavia fino ad una deformazione macroscopica di circa il 2% predomina lo stiramento molecolare [127, 128]. Per deformazioni superiori al 2%, l'incremento nell'ampiezza del D-period si produce prevalentemente attraverso il reciproco slittamento molecolare [43, 127]. Tuttavia quando si confronta l'incremento del periodo D (che costituisce quindi una misura della deformazione a livello fibrillare) con la deformazione macroscopica del tendine si nota che nella regione lineare le due grandezze non sono correlate linearmente e che il periodo aumenta di una quantità pari al 40% della deformazione macroscopica [45]. Questo implica che l'allungamento del tendine non possa essere dovuto interamente allo stiramento fibrillare e che quindi parte della deformazione possa aver luogo attraverso il movimento di intere fibrille: verosimilmente si avrebbe uno slittamento interfibrillare reso possibile dalla sostanza amorfa interfibrillare altamente viscosa ricca di acqua e proteoglicani [45]. L'esatto valore della deformazione, in corrispondenza del quale il contributo dello stiramento molecolare della tripla elica del collagene diventa piccolo in confronto allo slittamento molecolare e

fibrillare, dipende dalla velocità di deformazione e dal tipo di tessuto; tuttavia si ritiene che le interazioni laterali tra le fibrille collagene svolgano ormai un importante ruolo nel comportamento meccanico del collagene [113].

Quando si analizza il comportamento meccanico del tendine non si può prescindere dal considerare l'importante ruolo svolto dalla sostanza fondamentale ed in particolare dai PGs. Nei tendini rilassati la maggior parte dei filamenti di PGs sono disposti trasversalmente tra le fibrille collagene, estendendosi da una fibrilla all'altra come i pioli di una scala [134] ad intervalli regolari di circa 60 nm. Questi ponti formati dai PGs potrebbero quindi partecipare alla trasmissione delle forze da una fibrilla all'altra e nello stesso tempo concorrerebbero a mantenere l'integrità strutturale della matrice fibrosa [132, 134]. Le interazioni tra fibrille e PGs e quelle tra le catene dei GAGs sono entrambe non covalenti e perciò potenzialmente reversibili [133, 134]. E' perciò plausibile che le fibrille possano slittare le una sulle altre attraverso un meccanismo che prevede la rottura e la successiva ricostituzione dei suddetti legami; in questo modo perciò anche i PGs favorirebbero la trasmissione delle forze tensili e contribuirebbero alla deformazione tendinea. Recentemente numerosi autori [42, 142, 150] hanno dimostrato la presenza in molti materiali biologici (osso e matrice dei tendini) dei cosiddetti "sacrificial bonds" (letteralmente legami sacrificabili); si tratta di una quota di legami che può appunto essere "sacrificata" senza determinare alcuna destabilizzazione meccanica del materiale. Al contrario questi legami contribuiscono ad implementare la stabilità e la resistenza meccanica dei tessuti ed inoltre costituiscono un meccanismo reversibile di dissipazione energetica, in quanto la loro rottura durante l'applicazione di un carico tensile consentirebbe un'ulteriore deformazione del tessuto proteggendolo quindi da danni permanenti [53]. I sacrificial bonds sono legami deboli, di tipo non covalente e secondo Fantner [42] i tessuti biologici posseggono diversi tipi di legami che potrebbero agire da sacrificial bonds, come ad esempio i legami ionici, i legami a idrogeno, le interazioni idrofobiche e le forze di attrazione di Van der Waals. Poiché le interazioni tra collagene e

proteoglicani sono del tipo non covalente si può pensare che almeno parte di queste si comportino come sacrificial bonds e che pertanto lo scorrimento fibrillare, come pure lo slittamento delle singole molecole entro le fibrille durante lo stiramento si realizzi attraverso la rottura di questi legami sacrificabili [142]. Il meccanismo sarebbe potenzialmente reversibile: quando la sollecitazione meccanica viene rimossa i sacrificial bonds si ricostituiscono e si crea così un efficiente meccanismo per dissipare l'energia applicata sul tessuto e quindi per salvaguardarne l'integrità strutturale [42].

Il ruolo dei PGs nella trasmissione delle forze tensili non è comunque del tutto chiaro e verosimilmente il contributo dei PGs ad alto peso molecolare e dei SLRPs si esplica con modalità differenti. Evidenze sperimentali mostrano che nelle aree tensili dei tendini vi è sintesi e accumulo di aggregano, un PG macromolecolare altamente idrofilo e con elevata densità di cariche negative. L'aggregano svolgerebbe un'azione lubrificante favorendo lo scivolamento dei fascicoli di fibre gli uni sugli altri [161]. Più controverso appare il ruolo della decorina, un piccolo PG appartenente alla famiglia dei SLRP. E' noto che la decorina agisce come regolatore della fibrillogenesi in quanto limita il diametro fibrillare inibendo la fusione laterale tra le fibrille [133, 135, 164]. Poiché i filamenti di decorina appaiono connettere fibrille adiacenti è stato ipotizzato che essa concorra a mantenere l'integrità meccanica dei tessuti connettivi a fibrille parallele [23, 39]. Pins e collaboratori ipotizzano che almeno in vitro il ruolo della decorina sia quello di promuovere e preservare l'allineamento delle fibrille collagene, facilitando così lo slittamento interfibrillare e migliorando le interazioni laterali durante le deformazioni tensili [113]. Tuttavia quando le fibrille collagene vengono stirate in vitro molte delle interazioni collagene-decorina vanno incontro a rottura (sacrificial bonds) ed il contenuto in decorina delle fibrille (determinato mediante quantificazione dei residui di acido uronico) diminuisce [113]. Il distacco della decorina dalle fibrille potrebbe, ipoteticamente, costituire un segnale regolatore per i fibroblasti: in presenza cioè di elevati carichi meccanici il rilascio della decorina stimolerebbe tali cellule ad

incrementare la deposizione di collagene allo scopo di aumentare la resistenza alla trazione del tessuto [113]. E' stato anche ipotizzato che, poiché normalmente la decorina limita l'accrescimento in spessore delle fibrille, il suo distacco indotto dallo stiramento possa favorire la formazione di fibrille di diametro maggiore e quindi dotate di una maggiore resistenza alla trazione [35, 107].

In definitiva quindi nella deformazione del tendine sottoposto a stiramento meccanico intervengono meccanismi multipli che coinvolgono tutti i livelli della gerarchia strutturale tendinea. Screen ha infatti dimostrato che fenomeni di slittamento si realizzano a tutti i livelli della suddetta gerarchia [137, 138]; non soltanto quindi le singole molecole collagene ma anche le fibrille, le fibre ed i fasci di fibre possono scivolare gli uni sugli altri entro i rispettivi livelli di organizzazione contribuendo così alla deformazione macroscopica del tendine.



## **SCOPO DELLA TESI**

Durante la contrazione muscolare come pure durante lo stretching dell'unità muscolo-tendinea il tendine è assoggettato prevalentemente a sollecitazioni tensorie; minime sono le sollecitazioni flessorie, pressorie o di torsione. Numerosi ricercatori hanno studiato il comportamento meccanico dei tendini "*in vitro*" assoggettandoli a sollecitazioni tensorie [1, 23, 37, 45, 55, 118, 127, 128, 155, 156]. Tuttavia gli esperimenti condotti in vitro su tendini umani o di animali sono soggetti ad artefatti sperimentali più o meno grandi. Le prove di biomeccanica vengono infatti effettuate su tendini prelevati dalla loro sede naturale per essere poi inseriti in dispositivi che applicano sollecitazioni tensorie al tendine registrandone contemporaneamente le modificazioni in lunghezza in funzione del carico applicato. Le cause di artefatti possono essere imputabili all'apparato di prova o al campione di tendine da testare. La parte del dispositivo di più difficile messa a punto è il sistema di ancoraggio del campione. Infatti l'uso di pinze o morsetti che lacerano il tessuto durante lo stiramento crea un "*locus minoris resistentiae*" nel punto di presa, portando così a sottostimare il carico di rottura del tendine. La disidratazione del tessuto per esposizione all'aria è un altro fenomeno che si verifica nei sistemi descritti e per questo inconveniente si richiede che il sistema di ancoraggio e il tendine da testare siano mantenuti in ambienti ad umidità costante. Per quanto riguarda invece il campione da testare il problema più dibattuto è quello della sua tensione naturale. In passato infatti gli studi biomeccanici in vitro sono stati condotti su tendini animali o umani isolati solo dopo il prelievo. In queste condizioni tuttavia viene meno la fisiologica tensione esistente in vivo nel tendine che ad un'estremità è fissato all'osso e all'altra al ventre muscolare [44]. Nel momento in cui il tendine viene reciso per essere testato meccanicamente o analizzato istologicamente il tessuto subisce infatti un naturale raggrinzimento e raccorciamento. La mancata considerazione della tensione fisiologica in vivo del tendine costituisce quindi un ulteriore causa di artefatti sperimentali.

Ad oggi la maggior parte degli studi morfologici sui crimps tendinei sono stati condotti impiegando la microscopia ottica a luce polarizzata [28, 29, 92] e la microscopia elettronica a basso ingrandimento [62, 71], metodiche che lungi dal costituire le tecniche più adatte per studiare l'ultrastruttura dei crimps, non offrono una adeguata risoluzione spaziale e la necessaria visualizzazione tridimensionale del campione [116]; in particolare con le suddette metodiche di osservazione non è possibile risolvere le singole fibrille collagene e quindi analizzarne in dettaglio il comportamento in corrispondenza di ciascun crimp tendineo [44].

Alla luce di queste considerazioni e tenendo conto della stretta relazione esistente tra l'architettura del crimp e il comportamento biomeccanico del tendine, questa ricerca si propone di analizzare gli aspetti istologici ed ultrastrutturali del crimp tendineo in due diverse condizioni fisiologiche: nel tendine rilassato e nel tendine sottoposto a stretching statico passivo. Inizialmente verrà analizzata la struttura in vivo dei crimps tendinei allo scopo di chiarirne la reale struttura anatomica e successivamente verranno valutate le modificazioni qualitative e quantitative dei crimps nel meccanismo dello stiramento tendineo. Diversamente dalle ricerche condotte in passato, in questo studio i tendini vengono stirati *in vivo* ossia nella loro naturale posizione anatomica. A questo scopo è stato quindi utilizzato un modello animale di stretching statico nel quale si è cercato di riprodurre le condizioni meccaniche presenti in vivo durante l'esecuzione di un singolo esercizio di stretching statico passivo applicato al muscolo gastrocnemio e al tendine calcaneale. La posizione di stiramento è stata mantenuta per dieci minuti in quanto recenti studi di fisiologia [86] hanno dimostrato che un singolo esercizio di stretching statico applicato al muscolo gastrocnemio umano per 10 minuti determina "in vivo": a) un allungamento del tendine d'Achille; b) un decremento della sua viscosità; c) un aumento della sua elasticità.

## **MATERIALI E METODI**

### **Procedura sperimentale e prelievo dei tendini**

Lo studio è stato condotto su venti ratti femmine di ceppo Sprague-Dawley dell'età di tre mesi. Gli animali, stabulati secondo la normativa vigente sono stati anestetizzati con un'iniezione intraperitoneale di 87 mg/Kg di ketamina (Ketavet, Farmaceutici Gellini Spa, Italia) e 13mg/Kg di xylazina (Rompun, Bayer Italia Spa, Italia). Per indurre lo stiramento del tendine calcaneale nei ratti è stato appositamente progettato e realizzato un tutore in resina che consente la flessione dorsale del piede. Dopo anestesia il tutore veniva applicato ad uno dei due arti posteriori e si induceva quindi una graduale flessione dorsale del piede fino al raggiungimento di una posizione di angolazione gamba/piede di 55° (Fig. 1). Tale posizione veniva mantenuta per dieci minuti. Trascorso questo tempo e con l'arto ancora in tensione, nella regione peritendinea venivano praticate microiniezioni multiple sottocutanee di fissativo Karnovsky al 4% (paraformaldeide al 4% più glutaraldeide al 2,5% in tampone cacodilato 0.1M a pH 7.4). Successivamente si procedeva ad esposizione ed isolamento chirurgico del tendine calcaneale che veniva ulteriormente fissato *in situ* (ossia ancora vincolato all'osso e al muscolo) mediante abbondante gocciolamento dello stesso fissativo, allo scopo di preservare la tensione fisiologica del tendine presente in vivo e il grado di deformazione indotto dallo stretching (Fig. 2). L'arto controlaterale veniva mantenuto a riposo e il tendine così rilassato veniva analizzato come campione di controllo; tale tendine veniva esposto, isolato e fissato secondo le stesse modalità utilizzate per il tendine sottoposto a stretching. I ratti venivano quindi sottoposti ad eutanasia farmacologica mediante iniezione intracardiaca di Tanax (Hoechst, Frankfurt am Main, Germany). Dopo disarticolazione degli arti posteriori si procedeva al prelievo del tendine stirato e del suo controllo rilassato, entrambi fissati *in situ*.

Dieci tendini (cinque sottoposti a stretching e cinque controlli) venivano utilizzati per la microscopia ottica tradizionale e a luce polarizzata (MLP). Otto tendini (quattro stirati e quattro controlli) venivano processati per l'analisi ultrastrutturale al microscopio elettronico a

trasmissione (TEM) ed infine i restanti sei (tre stirati e tre controlli) venivano analizzati al microscopio elettronico a scansione (SEM).

Lo studio veniva condotto in accordo con la legislazione europea e italiana sulla sperimentazione animale e secondo i principi riportati nella “Guida per la cura e l’uso di animali da laboratorio”.

### **Microscopia ottica a luce polarizzata (MLP)**

Una parte dei campioni prelevati con le biopsie venivano ulteriormente fissati per immersione in formalina tamponata al 10% per 3-4 giorni. In seguito i campioni venivano disidratati utilizzando la serie ascendente degli alcoli: alcool etilico 80° per circa 3 giorni, alcool etilico 90° per 1 giorno, alcool etilico 95° per 3 ore, alcool etilico 100° per 2 ore.

Una volta disidratato, il preparato era immerso in xilolo e ivi mantenuto per 1-2 ore o comunque fino a completa diafanizzazione del tessuto, che doveva assumere un aspetto traslucido. Dopo la permanenza in xilolo, i campioni venivano trasferiti in paraffina fusa e posti in stufa, in modo che la paraffina non solidificasse. Nella paraffina fusa il tessuto deve avere il tempo di cedere del tutto lo xilolo di cui è impregnato; il soggiorno deve quindi essere di durata sufficiente ed è conveniente sostituire una o due volte la paraffina, in modo che essa possa sostituirsi completamente allo xilolo. Per tale motivo i campioni erano mantenuti una notte in paraffina I (la quale fonde ad una temperatura di 46°-48° C) e in seguito posti per 30-45 minuti in paraffina II (la quale fonde a 58°-60° C). Completata l’infiltrazione i campioni venivano inclusi, ponendoli in formelle metalliche precedentemente riempite di paraffina II fusa; durante questa fase, utilizzando degli aghi, i preparati venivano orientati in modo tale da consentire il successivo sezionamento longitudinale. Le formelle erano lasciate a temperatura ambiente fino a completa solidificazione che normalmente (2-3 giorni).

I blocchetti di paraffina, una volta estratti dalle formelle, venivano tagliati al microtomo in sezioni longitudinali di 6  $\mu\text{m}$  di spessore, le quali poi venivano asciugate in stufa a 37° C per un giorno e di seguito colorate.

Per la colorazione veniva utilizzato il Picrosirius (Sirius Red 0,5% in soluzione acquosa satura di acido picrico), un colorante azoico anionico che colora selettivamente il collagene, reagendo attraverso i suoi gruppi solforici acidi con i gruppi basici ionizzabili presenti nelle molecole del collagene [78]. Le molecole del colorante si dispongono parallelamente alle fibre collagene e questo allineamento concorre ad incrementare la naturale birifrangenza del tessuto tendineo. Dopo la colorazione i vetrini venivano coperti con balsamo e vetrino copri-oggetto, posti ad essiccare in stufa a 37° C per 2 giorni e quindi osservati al microscopio ottico a luce polarizzata (Leitz Ortholux 2, Wetzlar, Germany) per analizzare l'orientamento spaziale dei fasci di fibre collagene.

### **Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)**

I campioni destinati all'analisi ultrastrutturale al TEM venivano anzitutto ridotti in blocchetti di piccole dimensioni, quindi ulteriormente fissati per immersione in soluzione Karnowsky al 4% (paraformaldeide 4% più glutaraldeide 2,5% in tampone cacodilato 0,1 M a pH 7.4) per 1 giorno. Dopo la fissazione i campioni erano sottoposti a tre lavaggi in tampone cacodilato 0,1 M, lavaggi utili per eliminare il fissativo in eccesso che non è penetrato nel tessuto e non si è legato ai suoi componenti. Il fissativo in eccesso, infatti, potrebbe interferire con le fasi successive, e specialmente con la colorazione.

I campioni venivano quindi postfissati in tetrossido di osmio all'1% per 1 ora a temperatura ambiente. Il tetrossido di osmio viene utilizzato come fissativo secondario per la sua capacità di stabilizzare le membrane biologiche; è infatti solubile nei grassi e si combina con i lipidi insaturi, rendendoli insolubili negli alcoli.

In seguito i campioni venivano sottoposti a tre lavaggi in tampone cacodilato 0,1 M, quindi disidratati utilizzando la serie ascendente degli alcoli: alcool etilico 80° per 30 minuti, alcool etilico 90° per 30 minuti, alcool etilico 95° per 30 minuti e poi un secondo passaggio nello stesso alcool overnight, quindi alcool 100° per 1 ora. La disidratazione veniva condotta mantenendo tessuti e soluzioni in frigorifero alla temperatura di 4 C° in modo da rallentare ulteriormente i processi chimici degenerativi della morfologia e della chimica del tessuto in preparazione.

Dopo la disidratazione i campioni venivano trattati per 1 ora con ossido di propilene, sostanza molto volatile e penetrante, che è miscibile con l'alcool e con la resina utilizzata per l'inclusione. I preparati erano successivamente trasferiti in una miscela composta da tre parti di ossido di propilene e una di resina epossidica Araldite (3:1) per 45 minuti a temperatura ambiente; seguiva quindi un passaggio in una miscela composta da una parte di ossido di propilene e tre di resina (1:3) per 45 minuti a temperatura ambiente ed infine un ultimo passaggio in resina pura per 45 minuti in stufa a 60°C. In seguito i campioni venivano inclusi immergendo i frammenti di tessuto in appositi contenitori plastici riempiti di resina fluida; durante questa fase, attraverso l'ausilio di aghi sottili o piccoli stuzzicadenti di legno, i blocchetti di tessuto precedentemente adagiati nella resina, venivano ruotati ed orientati in modo che poi si presentino al taglio in maniera adatta.

Le formelle contenenti il materiale incluso erano poste in stufa a 60°C per 2-3 giorni allo scopo di consentire e accelerare la polimerizzazione della resina.

Le sezioni fini (700 Å) venivano ottenute con ultramicrotomo Reichert OMV3, e raccolte su appositi supporti; si tratta di retini, dischetti di materiale conduttore (in genere rame/rodio) molto sottili, formati da una rete di maglie su cui verranno appoggiate le sezioni. I retini venivano preventivamente rivestiti con un film trasparente (Formvar) con funzione di supporto per le sezioni stesse.



La formazione dell'immagine nel microscopio elettronico a trasmissione è legata alle differenti capacità di assorbire e deviare gli elettroni delle diverse strutture del tessuto. L'immagine che si forma mostra solo una gradazione di grigi di densità direttamente proporzionale alla quantità di elettroni in grado di raggiungere lo schermo. La colorazione, in microscopia elettronica, è quindi una tecnica che cerca di amplificare le differenti capacità di assorbire gli elettroni delle diverse strutture biologiche attraversate dal fascio. Questo obiettivo viene raggiunto con un meccanismo simile a quello impiegato per la colorazione delle sezioni su vetrino: il tessuto viene trattato con una sostanza che si lega preferenzialmente ad alcune strutture, rendendole meglio visibili, ma non ad altre: al posto del cromogeno, però, si utilizzano degli atomi di metalli pesanti, capaci di interferire con gli elettroni che vanno ad urtarli. I metalli più utilizzati sono l'uranio ed il piombo.

I retini con le sezioni adese venivano poi contrastati utilizzando, in sequenza, acetato di uranile al 3% in alcool 50° e citrato di piombo nella formulazione di Reynolds. Terminata ciascuna fase di colorazione, i retini, maneggiati con cura con delle pinzette a punte fini, venivano lavati in acqua distillata, fatti asciugare e osservati al TEM (Philips CM-10, Eindhoven, The Netherland) con una tensione di 80 kv.

### **Microscopia elettronica a scansione (SEM)**

I campioni per il SEM, venivano dapprima ridotti in piccole dimensioni così da poter essere successivamente montati sugli stubs (i supporti utilizzati per l'osservazione al SEM) e quindi fissati in fissativo Karnowsky al 4% (paraformaldeide 4% più glutaraldeide 2,5% in tampone cacodilato 0,1 M a pH 7.4) per 1 giorno. Dopo due lavaggi in tampone cacodilato 0,1 M (ciascuno della durata di 15 minuti), i campioni venivano post-fissati in tetrossido di osmio all'1% per 30 minuti a temperatura ambiente. In seguito i campioni venivano sottoposti a due lavaggi di 15 minuti in tampone cacodilato 0,1 M e quindi disidratati nella serie ascendente degli alcoli: due passaggi in alcol etilico 70° ciascuno della durata di 10 minuti, due passaggi

di 10 minuti in alcol etilico 80°, due passaggi di 10 minuti in alcol etilico 95° ed infine due passaggi di 10 minuti in alcol etilico 100°. I campioni venivano quindi essiccati mediante due passaggi (ciascuno della durata di 15 minuti) in esametildisilazano (HDMS), che a sua volta veniva poi allontanato per completa evaporazione. Successivamente i preparati venivano montati su stubs metallici mediante scotch biadesivo al carbone e rivestiti con uno strato di 20 nm di oro/palladio mediante tecnica di sputtering (Sputter Coater Emitech K550). La ricopertura del campione mediante metallizzazione viene condotta allo scopo di creare un film conduttivo che aumenti la conducibilità superficiale del tessuto durante l'interazione con il fascio elettronico. I campioni così allestiti erano infine osservati al SEM (Philips 515 and Philips XL30-FEG, Eindhoven, The Netherlands) utilizzando una sonda per elettroni secondari con una tensione di 15 kv.

### **Analisi isto-morfometrica**

L'analisi morfometrica veniva condotta su sezioni istologiche di 6 µm di spessore precedentemente colorate con Sirius Red ed osservate al microscopio ottico a luce polarizzata. Per l'analisi morfometrica è stato utilizzato un sistema computerizzato di analisi di immagine costituito da un microscopio a luce polarizzata e da una camera digitale ad alta risoluzione (DC200, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) che trasmette le immagini ad un computer dotato di un software per l'analisi e l'acquisizione delle immagini (QWin, Leica Microsystems Imaging Solution Ltd, Cambridge, UK). Per ciascun campione, venivano esaminati otto fotogrammi scelti casualmente ad un ingrandimento originale di 25x. In ciascuna immagine venivano misurati il numero dei crimps ed l'ampiezza dell'angolo al vertice di quattro crimps scelti sempre a caso. I risultati venivano espressi come media e relativa deviazione standard ( $\pm$ DS). La significatività della differenza tra i due gruppi (controlli vs stirati) veniva determinata mediante test T di Student per dati non appaiati. I dati venivano analizzati considerando un livello di significatività  $p < 0.05$ .

## **RISULTATI**

## **Microscopia ottica a luce polarizzata (MLP)**

### **Tendini rilassati**

Quando i tendini rilassati vengono osservati al microscopio ottico a luce polarizzata (MLP) i fasci di fibre collagene mostrano tratti a decorso rettilineo e parallelo all'asse maggiore del tendine interrotti da aree caratterizzate da bande chiare e scure di estinzione che si alternano tra loro; tali bande conferiscono a queste regioni tendinee un aspetto morfologico a zig-zag e corrispondono ai crimps tendinei già descritti in letteratura (Fig. 3).

Nello stesso tendine i crimps evidenziano una geometria variabile e appaiono ora come strutture simmetriche e regolari la cui forma ricorda quella di un triangolo isoscele, ora come triangoli scaleni; i crimps tendinei differiscono inoltre per la lunghezza dei segmenti rettilinei e per l'ampiezza dell'angolo al vertice individuato dai fasci nel punto ove essi cambiano bruscamente direzione (Fig. 4).

### **Tendini stirati**

Per quanto riguarda i tendini sottoposti a stiramento, la MLP evidenzia una certa variabilità di risposta allo stress meccanico. Infatti in alcune aree si assiste alla scomparsa della regolare alternanza di bande chiare e scure suggerendo la completa distensione dei fasci di fibre che risultano quindi paralleli e allineati lungo il maggiore asse tendineo.

In altre aree degli stessi preparati i fasci di fibre mostrano ancora una caratteristica birifrangenza, tuttavia i crimps appaiono numericamente ridotti e nettamente deformati, ossia più piatti rispetto a quanto osservato nei tendini di controllo (Fig. 5).

## **Microscopia elettronica a scansione (SEM)**

### **Tendini rilassati**

La microscopia elettronica a scansione (SEM) mostra che il tendine calcaneale risulta costituito da numerosi fascicoli di fibrille collagene, i quali appaiono separati e rivestiti dai sottili processi citoplasmatici dei tenociti localizzati nei setti endotenonici. La maggior parte

dei fascicoli evidenzia un chiaro andamento planare a zig-zag riconoscibile già a piccolo ingrandimento (Fig. 6). A maggior ingrandimento si può notare che i fasci di fibrille non descrivono semplicemente un'onda sinuosa, ma appaiono piuttosto come una sequenza di segmenti fibrillari rettilinei connessi da brusche discontinuità o cerniere in corrispondenza delle quali tutte le fibrille di un fascio cambiano simultaneamente direzione. Pertanto lungo i fascicoli fibrillari si susseguono segmenti di lunghezza variabile ove le fibrille appaiono rettilinee e segmenti più brevi in corrispondenza dei quali le fibrille cambiano bruscamente direzione formando un crimp con un angolo molto accentuato (Fig. 7).

La lunghezza dei segmenti fibrillari lineari varia entro un range di 30-50  $\mu\text{m}$ , ma sono stati riscontrati segmenti anche più brevi di 5  $\mu\text{m}$ .

In corrispondenza di ogni crimp, le singole fibrille collagene mostrano dei nodi, corrispondenti ad improvvisi cambiamenti direzionali, che sono stati indicati con il termine di "*crimps fibrillari*" [44] (Fig. 8a). A maggior ingrandimento tali nodi hanno evidenziato una sorprendente eterogeneità morfologica; essi corrispondono infatti ad aspetti inusuali ed irregolari delle singole fibrille collagene: alcune fibrille appaiono parzialmente schiacciate, altre subiscono una torsione attorno al proprio asse assumendo la forma di una baionetta, in altre fibrille ancora si osserva una combinazione di torsione e piegamento (Fig. 8b). In corrispondenza di questi nodi molte fibrille perdono la loro forma cilindrica e mostrano una sorta di deformazione localizzata che si estende limitatamente a pochi (2-3) D-period, in quanto a monte e a valle del nodo le fibrille presentano forma e aspetto normale (Fig.9).

Ogni crimp tendineo include parecchi crimps fibrillari ed inoltre lungo la stessa fibrilla sono stati osservati crimps fibrillari multipli, nella forma di due, tre o più nodi consecutivi.

### **Tendini stirati**

Nei tendini sottoposti a stiramento la maggior parte dei fasci fibrillari mostra un andamento rettilineo e una disposizione parallela al maggior asse tendineo.

Solo in alcuni segmenti si possono ancora riconoscere dei crimps, i quali però apparivano appiattiti e parzialmente stirati: infatti in questi casi le fibrille risultano stirate solo in corrispondenza di un versante del crimp. A livello dei crimps parzialmente deformati, i crimps fibrillari delle singole fibrille collagene sono tuttavia ancora evidenziabili (Fig. 10).

In altre zone del medesimo preparato i fasci e le loro fibrille costitutive appaiono invece completamente rettilinei e distesi evidenziando quindi una completa estinzione dei crimps in seguito a stretching. Anche in questo caso ad una più attenta osservazione a forte ingrandimento, lungo le fibrille completamente distese sono ancora osservabili nodi residui corrispondenti ai crimps fibrillari descritti nei tendini rilassati (Fig. 11); ad elevato ingrandimento questi crimps fibrillari mostrano gli stessi peculiari aspetti di torsione e schiacciamento riscontrati nei tendini di controllo non sottoposti a stiramento.

### **Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)**

#### **Tendini rilassati**

La microscopia elettronica a trasmissione ha confermato i dati istologici e ha fornito immagini perfettamente sovrapponibili a quelle della scansione.

Nei tendini rilassati le fibrille collagene di alcuni fasci cambiano repentinamente direzione e il piegamento delle stesse si associa alla comparsa di irregolarità nella forma e nell'aspetto ultrastrutturale.

Tali fibrille appaiono schiacciate, piegate oppure piegate e ritorte: questi aspetti corrispondono quindi ai crimps fibrillari già descritti ed evidenziati al SEM (Fig. 12a-c). L'analisi ultrastrutturale rivela inoltre nuovi originali aspetti delle fibrille collagene in corrispondenza dei crimps fibrillari: alcune fibrille perdono infatti la loro caratteristica bandeggiatura o D-period e mostrano un alterato arrangiamento microfibrillare (Fig. 12c): le microfibrille appaiono infatti disorganizzate, irregolarmente distanziate e apparentemente prive del definito ordine intermolecolare che le caratterizza altrove nella stessa fibrilla.

Come già riscontrato nell'analisi al SEM, lo stesso crimp tendineo appare composto da numerosi crimps fibrillari ed inoltre la stessa fibrilla collagene frequentemente mostra crimps fibrillari multipli lungo il suo decorso (Fig. 13).

### **Tendini stirati**

Nei tendini sottoposti a stiramento la maggior parte dei fasci di fibrille evidenzia una disposizione rettilinea e parallela (Fig. 14a); i crimps si osservano sporadicamente e ove presenti appaiono costituiti da crimps fibrillari che mantengono inalterate le proprie caratteristiche ultrastrutturali (Fig. 14b).

### **Analisi istomorfometrica**

L'analisi morfometrica condotta sulle sezioni istologiche osservate mediante l'ausilio della luce polarizzata ha fornito risultati in accordo con i dati istologici ed ultrastrutturali, evidenziando modificazioni sia nel numero che nell'ampiezza dell'angolo al vertice dei crimps tendinei.

Il numero totale dei crimps misurato nei tendini rilassati e nei tendini sottoposti a stiramento è stato rispettivamente di  $74,4 \pm 13,4$  e  $39,6 \pm 17,4$ , indicando quindi una riduzione del 46,7 % durante lo stiramento del tendine; la differenza tra i due valori è risultata statisticamente significativa ( $P < 0.01$ ). La figura 15 riporta l'istogramma della distribuzione di frequenza del numero dei crimps nei tendini rilassati e in quelli sottoposti a stiramento.

L'ampiezza media dell'angolo al vertice nei tendini rilassati e in quelli stirati è rispettivamente  $148^\circ \pm 5$  e  $165^\circ \pm 6$ , la differenza tra le due medie è risultata statisticamente significativa ( $P < 0.005$ ). La figura 16 riporta la distribuzione di frequenza dell'ampiezza dell'angolo al vertice dei crimps nei tendini rilassati e in quelli sottoposti a stiramento.

## **DISCUSSIONE**



La funzione dei tendini è quella di trasmettere gli impulsi meccanici derivanti dalla contrazione muscolare alle leve scheletriche; è facilmente intuibile che per svolgere questa funzione deve esistere un rapporto costante tra forza di contrazione muscolare e resistenza alla tensione del tendine. Il tendine deve quindi possedere in ogni momento una forza tensoria tale da resistere alla massima potenza sviluppata da una contrazione muscolare. Il tessuto tendineo deve inoltre esplicare una sorta di modulazione sulla contrazione muscolare, in maniera da ammortizzare ed impedire, brusche e violente sollecitazioni motorie. L'elevato carico meccanico che un tendine può sostenere è dovuto alla sua particolare struttura costituita da fibre e fasci di fibre collagene orientati parallelamente e allineati lungo il maggiore asse tendineo; la disposizione delle fibre e dei fasci è strettamente correlata e determinata dalla funzione che il tendine è chiamato a svolgere: dal momento che durante la contrazione muscolare come pure durante lo stiramento passivo un tendine è assoggettato per lo più a stress tensili uniassiali, le fibre nel tessuto risultano allineate nella direzione di applicazione del carico stesso. Tuttavia all'interno del tendine i fasci di fibre non appaiono mai completamente rettilinei, ma mostrano piuttosto un andamento ondulato a zig-zag che ricorda una forma d'onda triangolare nota in letteratura come crimp [28, 29, 32, 50, 55, 75, 82, 83, 103, 123, 124, 137, 158]. La presenza del crimp giustifica il particolare aspetto dei tendini in luce polarizzata: la regolare alternanza di bande chiare e scure di estinzione è da attribuire al periodico cambiamento di direzione dei fasci di fibre lungo il tendine [28, 29, 32, 50, 55, 123, 124, 155, 156]. Applicando al tendine una graduale sollecitazione tensoria, l'ondulazione tende a scomparire e per deformazioni pari al 4% circa della lunghezza originaria il tessuto tendineo assume una configurazione completamente rettilinea dovuta alla distensione dei fasci di fibre collagene [37, 55, 56, 118, 146]. La presenza dei crimps giustifica il comportamento meccanico del tendine nella prima parte non lineare della curva stress-strain (tensione-deformazione); l'allungamento che si manifesta in questa regione sarebbe determinato unicamente dalla progressiva distensione dei crimps tendinei e quindi dal conseguente

allineamento dei fasci di fibre nella direzione di applicazione del carico stesso in assenza di stiramenti e/o modificazioni a carico degli altri componenti della gerarchia strutturale del tendine [4, 32, 50, 55, 137, 138]. E' stato stimato che la sola distensione dei crimps sia sufficiente a determinare una deformazione tendinea dell'ordine dell'1-3% [55, 71, 77, 80].

All'interno del tendine il crimp agirebbe come shock-absorber consentendo piccole deformazioni longitudinali delle singole fibre senza danneggiamento o modificazioni plastiche del tessuto [18, 32, 50, 55, 105, 137, 138]; l'effetto di smorzamento di carichi impulsivi consentirebbe ai tendini di resistere ad improvvisi e potenzialmente dannosi stiramenti [55, 71, 77]. Ad oggi la maggior parte degli studi finalizzati ad analizzare la relazione tra architettura dei crimps e comportamento meccanico del tendine sono stati condotti su tendini prelevati dalla loro naturale sede anatomica senza pertanto tenere conto della tensione fisiologica in vivo del tessuto [44]. In questo studio sia i tendini rilassati che quelli sottoposti a stiramento sono stati fissati in situ proprio allo scopo di preservare la tensione fisiologica presente prima dell'espanto e della successiva analisi istologica ed ultrastrutturale. Le osservazioni al MLP hanno evidenziato che nei tendini rilassati i fasci di fibre seguono un andamento ondulato a zig-zag; questa periodica variazione nell'orientamento dei fasci produce la caratteristica alternanza di bande chiare e scure di estinzione già descritta in letteratura e corrispondente ai crimps o WLS (wave-like structures). In letteratura i crimps tendinei sono sempre stati schematizzati come triangoli isosceli regolari, secondo il classico modello proposto da Diamant [32]; tuttavia le mie osservazioni dimostrano che in vivo i crimps presentano una notevole variabilità di forma e dimensioni. Non tutti i crimps osservati risultano di forma regolare in quanto accanto a crimps relativamente simmetrici sono stati osservati crimps a forma di triangoli scaleni piuttosto irregolari; analoga variabilità è stata osservata nella lunghezza dei crimps e nella direzione del crimping dei fasci di fibre.

La microscopia elettronica a scansione ha confermato la variabilità di forma e di dimensioni dei crimps nei tendini rilassati ed inoltre ha dimostrato l'arrangiamento planare dei crimps

lungo l'asse tendineo. Sempre al SEM è stato osservato che i crimps non mostrano un aspetto meramente sinuoso, così come riportato in letteratura [28, 49, 158], ma appaiono piuttosto come una successione di segmenti fibrillari rettilinei collegati da brusche discontinuità angolari o cerniere, in corrispondenza delle quali tutte le fibrille di un fascio cambiano repentinamente direzione. L'analisi a forte ingrandimento al SEM e al TEM ha rivelato che, in corrispondenza di ogni crimp tendineo le singole fibrille collagene formano nodi di forma eterogenea ed inusuali nel loro aspetto; il cambiamento di direzione risulta infatti associato a una deformazione fibrillare localizzata che mostra una certa variabilità morfologica anche tra fibrille adiacenti dello stesso fascicolo. Tipicamente alcune fibrille perdono la loro forma cilindrica e appaiono strozzate, altre risultano ritorte attorno al proprio asse a guisa di baionetta ed altre ancora presentano una complessa combinazione di piegamento e torsione. In corrispondenza di questi nodi inoltre molte fibrille perdono la loro caratteristica periodicità assiale (D-period) ed evidenziano la componente microfibrillare. Nelle fibrille tendinee di tipo T, le microfibrille costitutive sono disposte in modo quasi esattamente parallelo all'asse fibrillare e tale arrangement rende conto del caratteristico periodo che si ripropone ogni 67 nm [106, 117, 125]. Tuttavia ove le fibrille cambiano direzione è stato osservato un certo grado di disordine molecolare in quanto le microfibrille appaiono disorganizzate ed irregolarmente distanziate giustificando così la scomparsa del periodo; analoghe alterazioni sono state osservate in precedenti studi condotti dal mio gruppo di laboratorio [116] impiegando la microscopia a forza atomica in tapping-mode (AFM), tecnica di osservazione dotata di una risoluzione spaziale ancora superiore. Le suddette modificazioni di forma e di struttura risultano limitate al tratto di cambiamento direzionale (che ha luogo nello spazio di pochi D-periods) in quanto a monte e a valle del nodo le fibrille mostrano forma e aspetti normali. Questi peculiari aspetti delle singole fibrille collagene descritti in corrispondenza di ciascun crimp tendineo sono stati indicati dal mio gruppo di ricerca con il termine di *crimps fibrillari* [44] e rappresentano pertanto la controparte fibrillare dei crimps tendinei, cioè dei

crimps associati ai fasci di fibre collagene, osservabili nelle sezioni istologiche in luce polarizzata. Ogni crimps tendineo risulterebbe quindi dalla giustapposizione di molteplici crimps fibrillari delle singole fibrille di un fascicolo; inoltre l'analisi ultrastrutturale ha evidenziato la presenza di crimps fibrillari multipli lungo la stessa fibrilla, separati tra loro da distanze molto variabili (da pochi D-periods fino a diverse decine di  $\mu\text{m}$ ). E' importante sottolineare che in diversi studi del passato [33, 49, 81] si è accennato alla presenza nel tendine di una successione di segmenti fibrillari rettilinei e di brusche discontinuità; tuttavia questi aspetti morfologici sono stati a lungo considerati come artefatti sperimentali. Numerosi autori [17, 112] hanno infatti ipotizzato che l'ondulazione dei fasci di fibre si verifichi secondariamente alla recisione del tendine dalle sue connessioni muscolari e ossee per la semplice retrazione delle fibre elastiche. Inoltre l'accentuato piegamento dei fasci di fibre è stato interpretato come un semplice raggrinzimento del tessuto indotto dai fissativi aldeidici e dalla contrazione del mezzo di inclusione [158]. Nel modello sperimentale realizzato dal mio gruppo di ricerca i tendini sono stati fissati in vivo e in situ proprio allo scopo di preservare la tensione fisiologica del tendine e pertanto si può escludere che l'accentuato aspetto a zig-zag mostrato dai fascicoli fibrillari sia da attribuire al naturale ritorno elastico del tessuto a seguito del prelievo. Inoltre poiché l'allestimento dei campioni per il SEM e per l' AFM non prevede l' utilizzo di un mezzo di inclusione e dal momento che i crimps sono stati riscontrati con tutte le tecniche di visualizzazione impiegate si può concludere che questi bruschi cambiamenti di direzione delle fibre e delle fibrille collagene costituiscano una normale caratteristica dei tendini in vivo.

Le mie osservazioni suggeriscono che il crimp fibrillare sia correlato ad un cambiamento dell'arrangiamento microfibrillare: la struttura interna della fibrilla si modifica localmente per adattarsi alle richieste funzionali del tessuto tendineo, ossia per consentirne lo stiramento e il successivo ritorno elastico al cessare della sollecitazione tensoria.

Per quanto concerne i tendini sottoposti a stretching, fissati in situ e sotto tensione, la MLP ha evidenziato una marcata riduzione dei crimps tendinei. In realtà è stata osservata una certa variabilità di risposta allo stress meccanico che si accorda con il modello teorico di reclutamento proposto da Hansen [55]: in seguito a stiramento i crimps presenti lungo un fascicolo non scompaiono simultaneamente ma gradualmente, ed è possibile osservare un gradiente di scomparsa delle bande di estinzione che procede dalle due estremità verso il centro del tendine e dai fascicoli più superficiali verso quelli posti più in profondità. In alcune zone del tendine infatti la caratteristica alternanza di bande chiare e scure non è più rilevabile, indicando quindi il completo allineamento dei fasci di fibre e la completa estinzione dei crimps tendinei.

In altre regioni del medesimo campione tendineo i crimps sono ancora riconoscibili ma appaiono, già al semplice esame istologico, numericamente inferiori e decisamente appiattiti, in quanto l'angolo individuato dal piegamento dei fasci risulta ampio. Verosimilmente il reclutamento sequenziale dei crimps tendinei durante lo stiramento è da attribuire alla notevole variabilità dell'angolo del crimp in fascicoli differenti; pertanto tale differenza sito-specifica dell'ampiezza dell'angolo potrebbe determinare una distribuzione non uniforme del carico meccanico lungo il tendine [111, 170].

I risultati dell'analisi morfometrica sono in perfetto accordo con quanto osservato nelle sezioni istologiche, poiché si è riscontrato che, dopo stretching, il numero dei crimps si riduce del 46,7% ( $p < 0.01$ ), mentre l'ampiezza dell'angolo al vertice del crimp tendineo aumenta da  $148^\circ$  (tendini rilassati) a  $165^\circ$  (tendini stirati) in modo statisticamente significativo ( $p < 0.005$ ). Vale la pena sottolineare che la scelta di misurare la variazione dell'angolo al vertice è stata motivata dalla osservazione che i crimps tendinei mostrano in vivo una geometria altamente variabile che non si accorda con il modello proposto da Diamant [32]. Questo modello descrive i crimps come onde triangolari con angoli della base uguali; nelle analisi morfometriche condotte in passato [65, 92, 110] e fondate sul suddetto modello veniva quindi

invariabilmente misurato uno dei due angoli alla base assumendo che questi fossero equivalenti. Poiché in vivo la maggior parte dei crimps osservati in questa ricerca mostra un aspetto irregolare questa approssimazione non è applicabile e si è quindi scelto di considerare come angolo del crimp l'angolo al vertice, in quanto le variazioni di ampiezza di tale angolo rispecchierebbero più fedelmente le modificazioni morfologiche del crimp durante lo stiramento.

La riduzione numerica dei crimps dopo stretching fornisce quindi una misura del grado di deformazione totale, mentre l'aumento dell'angolo al vertice rispecchia la parziale distensione e quindi l'appiattimento di quei crimps che permangono dopo l'applicazione della forza di stiramento.

L'analisi al SEM conferma questa variabilità di risposta, in quanto, nel contesto di uno stesso fascicolo, accanto a crimps deformati parzialmente, in corrispondenza dei quali le fibrille risultano stirate solo in corrispondenza di un lato del crimp, è possibile osservare crimps completamente deformati nei quali i fasci fibrillari risultano allineati lungo la direzione del carico applicato.

A forte ingrandimento tuttavia, lungo le fibrille completamente distese per effetto dello stiramento, sono ancora riconoscibili quelle peculiari e localizzate deformazioni corrispondenti ai crimps fibrillari; l'analisi delle sezioni sottili al TEM conferma questo dato e dimostra che dopo stiramento i crimps fibrillari mantengono inalterate le loro caratteristiche ultrastrutturali (torsione, schiacciamento, assenza di periodo). In definitiva dopo stiramento i crimps fibrillari permangono anche in quelle zone del tendine dove i crimps tendinei non sono più istologicamente identificabili (scomparsa delle bande scure di estinzione).

La loro persistenza dopo stiramento suggerisce quindi che i crimps fibrillari siano le reali strutture che agiscono come shock absorber nel tendine durante le prime fasi dello stiramento e che consentono al tendine di recuperare la struttura istologica a fasci a zig-zag al cessare della forza tensile applicata.

Crimps fibrillari sono stati riscontrati in numerosi altri tendini e finanche in alcuni legamenti soggetti a forze tensili prevalentemente unidirezionali, come i legamenti collaterali del ginocchio e il legamento patellare [115]; viceversa i crimps fibrillari non sono mai stati descritti in quei tessuti sottoposti a forze multidirezionali o a repentini cambiamenti di forma e dimensioni, come il derma, le guaine tendinee e dei nervi, la parete dei vasi sanguiferi e lo stroma connettivale di organi parenchimatosi. In particolare sembra che la distribuzione tissutale dei crimps fibrillari sia in qualche modo dettata dal tipo di fibrille presenti nei tessuti connettivi; infatti le analisi ultrastrutturali condotte dal mio gruppo di ricerca dimostrano che i crimps fibrillari risultano invariabilmente associati alle fibrille di tipo T [115], caratterizzate da diametro elevato ed eterogeneo e costituite da microfibrille quasi parallele all'asse fibrillare; tali fibrille sono tipiche di quei tessuti sottoposti ad elevate forze tensili di tipo uniassiale come i tendini, i legamenti e le aponeurosi [106]. La maggior parte degli altri tessuti connettivi sono costituiti da fibrille di tipo C, più sottili e con un diametro estremamente uniforme, le cui microfibrille mostrano un arrangiamento elicoidale con un angolo di avvitamento costante di  $17^\circ$  rispetto all'asse fibrillare. Questo angolo rende conto del periodo  $D$  più breve riscontrabile in tali fibrille [ $64\text{nm} \approx 67\text{nm} \cdot \cos(17^\circ)$ ] rispetto alle fibrille di tipo T [93] ed inoltre l'arrangiamento elicoidale risulta stabilizzato da un peculiare legame crociato trifunzionale che coinvolge un residuo di istidina (istidina-idrossilisina-norleucina o hys-HLNL); questo legame è presente esclusivamente in quei tessuti ove sono state descritte fibrille elicoidali, in quanto esso può costituirsi solo se le molecole risultano esattamente sfasate di  $17^\circ$  le une rispetto alle altre [173]. In questi tessuti le fibrille tipicamente risultano riunite in sottili fasci ondulati o elicoidali e spesso si organizzano a costituire networks tridimensionali particolarmente adatti a resistere a sollecitazioni pluridirezionali [106].

E' stato ipotizzato [115, 116] che sia la differente architettura microfibrillare a conferire ai due tipi di fibrille una diversa flessibilità e quindi a determinare una diversa risposta meccanica al piegamento:

- a) le fibrille di tipo C sono meglio stabilizzate dall'avvolgimento elicoidale delle loro subunità e sono in grado di adattarsi a bruschi piegamenti e cambiamenti di direzione senza modificazioni della loro forma cilindrica e/o dell'arrangiamento microfibrillare. In queste fibrille non sono mai state osservate quelle caratteristiche ed originali deformazioni (schiacciamento, torsione, scomparsa del periodo) che contraddistinguono i crimps fibrillari riscontrati nei tendini, pertanto la struttura interna e i rapporti intermolecolari si mantengono inalterati per tutta l'estensione della fibrilla.
- b) le fibrille tendinee di tipo T sono strutture spesse e rigide che dal punto di vista meccanico si comportano più come tubi piuttosto che come cilindri solidi a forma di bastoncino quali esse realmente sono.

Studi di micro-manipolazione [53] hanno dimostrato che le fibrille tendinee sottoposte a compressione assiale sono in grado di tollerare solo una limitata curvatura prima di andare incontro a cedimento strutturale; inoltre quando tali fibrille si piegano esse non formano un'ansa come previsto per una struttura cilindrica solida, ma si deformano esattamente come farebbe un cilindro cavo. Questo comportamento è stato spiegato assumendo che le fibrille siano strutture non omogenee provviste di un "guscio" e di un "core" con differenti proprietà meccaniche. Secondo Gutsman [53] i legami crociati intermolecolari tenderebbero a localizzarsi preferenzialmente alla superficie delle fibrille formando così un guscio rigido. La porzione centrale della fibrilla presenterebbe invece un maggior disordine molecolare e proprietà meccaniche paragonabili a quelle di un fluido. Entro questo core meno denso le molecole collagene sarebbero libere di riorientarsi e di slittare le une rispetto alle altre contribuendo così alla distribuzione degli stress meccanici [126]. Per via di questa struttura non omogenea tali fibrille quindi si deformano e si schiacciano facilmente quando vanno incontro a piegamento. L'elevato diametro costituisce inoltre un ulteriore fattore che concorre a ridurre la flessibilità di queste fibrille; è noto infatti che la flessibilità fibrillare e il diametro sono inversamente correlati [106]. Le fibrille di tipo T sono scarsamente resistenti allo stress



di taglio indotto dal piegamento e pertanto, quando si piegano, vanno incontro a cedimento strutturale e riarrangiano le loro subunità in una diversa sezione trasversa, ossia schiacciandosi o rigonfiandosi. La torsione spesso osservata nel punto di flessione è un altro modo per minimizzare lo stress di taglio, semplicemente variando il raggio di curvatura in punti opposti della fibrilla. Di conseguenza la struttura interna di queste fibrille si modifica localmente (crimp fibrillare) per adattarsi alle richieste funzionali del tessuto. Le fibrille tendinee sono normalmente sottoposte a forze tensili uniassiali e per offrire la massima resistenza a tali stress risultano allineate nella direzione di applicazione del carico stesso; esse sono quindi disposte longitudinalmente e mostrano un arrangiamento rettilineo per la maggior parte della loro estensione. Per queste fibrille quindi ogni deviazione dalla “linea retta” costituisce, almeno dal punto di vista funzionale, un’eccezione e pertanto ogni cambiamento di direzione (crimp fibrillare) verosimilmente produce una perdita localizzata di ordine molecolare.

## **BIBLIOGRAFIA**

- [1] **Abrahams M.** Mechanical behaviour of tendon in vitro. A preliminary report. *Med Biol Eng* **1967**; 5: 433-43.
- [2] **Ameye L, Aria D, Jepsen K, Oldberg A, Xu T, Young MF.** Abnormal collagen fibrils in tendons of biglycan/fibromodulin-deficient mice lead to gait impairment, ectopic ossification, and osteoarthritis. *FASEB J* **2002**; 6: 673-680.
- [3] **Angel G, Georghe V.** Interferometric evaluation of collagen concentration in tendon fibers. *Conn Tissue Res* **1985**; 13: 323-337.
- [4] **Atkinson TS, Ewers BJ, Haut RC.** The tensile and stress relaxation responses of human patellar tendon varies with specimen cross-sectional area. *J Biomech* **1999**; 32: 907-914.
- [5] **Avery NC, Bailey AJ.** Enzymic and non-enzymic cross-linking mechanism in relation to turnover of collagen: relevance to aging and exercise. *Scand J Med Sci Sports* **2005**; 15: 231-240.
- [6] **Bailey AJ.** Molecular mechanisms of ageing in connective tissues. *Mech Ageing Dev* **2001**; 122: 735-755.
- [7] **Bailey AJ, Paul RG, Knott L.** Mechanism of maturation and ageing of collagen. *Mech Ageing Dev* **1998**; 106: 1-56.
- [8] **Bailey AJ, Peach CM.** Isolation and structural identification of a labile intermolecular crosslink in collagen. *Biochem Biophys Res Commun* **1968**; 33: 812-819.
- [9] **Baynes JW, Monnier VM.** The Maillard reaction in aging, diabetes and nutrition. New York: Alan Liss, **1984**.
- [10] **Banes AJ, Tsuzaki M, Hu P, Brigman B, Brown T, Almekinders L, Lawrence WT, Fischer T.** PDGF-BB, IGF-I and mechanical load stimulate DNA synthesis in avian tendon fibroblasts in vitro. *J Biomech* **1995**; 28: 1505-1513.
- [11] **Banes AJ, Horesovsky G, Larson C, Tsuzaki M, Judex S, Archambault J, Zernicke R, Herzog W, Kelly S, Miller L.** Mechanical load stimulates expression of novel genes in vivo and in vitro in avian flexor tendon cells. *Osteoarthritis Cartilage* **1999**; 7:141-153.
- [12] **Becker W, Krah H.** Die Tendopathien. Stuttgart: G. Thieme, **1978**.
- [13] **Bella J, Eaton M, Brodsky B, Berman HM.** Crystal and molecular structure of a collagen-like peptide at 1.9 Å resolution. *Science* **1994**; 266: 75-81.
- [14] **Bella J, Brodsky B, Berman HM.** Hydration structure of a collagen peptide. *Structure* **1995**; 3: 893-906.
- [15] **Berisio R, Granata V, Vitagliano L, Zagari A.** Characterization of collagen-like heterotrimers: implications for triple-helix stability. *Biopolymers* **2004**; 73: 682-688.

- [16] **Bouteille M, Pease DC.** The tridimensional structure of native collagenous fibrils, their proteinaceous filaments. *J Ultrastruct Res* **1971**; 35: 314-38.
- [17] **Brooks GA, Fahey TD.** Fundamentals of human performance. McMillian Ed. New York. **1987**
- [18] **Butler DL, Grood ES, Noyes FR, Zernicke RF.** Biomechanics of ligaments and tendons. *Exerc Sport Sci Rev* **1978**; 6: 125-181.
- [19] **Canty EG, Lu Y, Meadows RS, Shaw MK, Holmes DF, Kadler KE.** Coalignment of plasma membrane channels and protrusions (fibripositors) specifies the parallelism of tendon. *J Cell Biol* **2004**; 165: 553-563.
- [20] **Canty EG, Kadler KE.** Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci* **2005**; 118: 1341-1353.
- [21] **Cassim JY, Tobias PS, Taylor EW.** Birefringence of muscle proteins and the problem of structural birefringence. *Biochim Biophys Acta* **1968**; 168: 463-471.
- [22] **Chiquet M.** Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. *Matrix Biol* **1999**; 18: 417-426.
- [23] **Cribb AM, Scott JE.** Tendin response to tensile stress: an ultrastructural investigation of collagen: proteoglycan interactions in stressed tendon. *J Anat* **1995**; 187: 423-428.
- [24] **Curwin S.** Biomechanics of tendon and the effects of immobilization. *Foot Ankle Clin* **1997**; 2: 371-389.
- [25] **Dale WC, Baer E.** Fibre-buckling in composite systems: a model for the ultrastructure of uncalcified collagen tissues. *J Mater Sci* **1974**; 9: 369-382.
- [26] **Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE, Iozzo RV.** Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol* **1997**; 136: 729-743.
- [27] **De Campos Vidal B.** Aggregational state and molecular order of tendons as a function of age. *Matrix* **1990**; 10: 48-57.
- [28] **De Campos Vidal B.** Crimp as a part of a helical structure. *CR Acad Sci III* **1995**; 318:173–178.
- [29] **De Campos Vidal B.** Image analysis of tendon helical superstructure using interference and polarized light microscopy. *Micron* **2003**; 34: 423–432.
- [30] **Del Torto U.** Anatomia e fisiopatologia del tendine. Rel. XLXVI Congr. SIOT Roma, **1961**.
- [31] **Derwin KA, Soslowsky LJ, Kimura JH, Plaas AH.** Proteoglycans and glycosaminoglycan fine structure in the mouse tail tendon fascicle. *J Orthopaed*

Res **2001**; 19: 269–277.

- [32] **Diamant J, Keller A, Baer E, Litt M, Arridge RG.** Collagen: ultrastructure and its relation to mechanical properties as a function of ageing. *Proc R Soc B* **1972**; 180: 293–315.
- [33] **Dlugosz J, Gathercole LJ, Keller A.** Transmission electron microscope studies and their relation to polarizing light microscopy in rat tail tendon. *Micron* **1978**; 9: 71-82.
- [34] **Duance VC, Restall DJ, Beard H, Bourne FJ, Bailey AJ.** The location of three collagen types in skeletal muscle. *FEBS Lett* **1977**; 79: 248-252.
- [35] **Doillon CJ, Dunn MG, Bender E, Silver FH.** Collagen fiber formation in repair tissue: development of strength and toughness. *Coll Relat Res* **1985**; 5: 481-92.
- [36] **Dyer RF, Enna CD.** Ultrastructural features of adult human tendon. *Cell Tissue Res* **1976**; 168: 247-259.
- [37] **Elliott DH.** Structure and function of mammalian tendon. *Biol Rev Camb Philos Soc* **1965**; 40: 392-421.
- [38] **Engel J, Prockop DJ.** The zipper-like folding of collagen triple-helices and the effects of mutations that disrupt the zipper. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **1991**; 20: 137-152.
- [39] **Evanko SP, Vogel KG.** Proteoglycan synthesis in fetal tendon is differentially regulated by cyclic compression in vitro. *Arch Biochem Biophys* **1993** Nov 15;307(1):153-64.
- [40] **Eyre DR, Paz MA, Gallop PM.** Cross-linking in collagen and elastin. *Annu Rev Biochem* **1984**; 53: 717-748.
- [41] **Ezura Y, Chakravarti S, Oldberg A, Chervoneva I, Birk DE.** Differential expression of lumican and fibromodulin regulate collagen fibrillogenesis in developing mouse tendons. *J Cell Biol* **2000**; 151: 779-787.
- [42] **Fantner GE, Oroudjev E, Schitter G, Golde LS, Thurner P, Finch MM, Turner P, Gutschmann T, Morse DE, Hansma H, Hansma PK.** Sacrificial bonds and hidden length: unraveling molecular mesostructures in tough materials. *Biophys J* **2006**; 90: 1411-1418.
- [43] **Folkhard W, Mosler E, Geercken W, Knorz E, Nemetschek-Gansler H, Nemetschek T, Koch HJ.** Quantitative analysis of the molecular sliding mechanism in native tendon collagen – time resolved dynamic studies using synchrotron radiation. *Int J Biol Macromol* **1987**; 9: 169-175.
- [44] **Franchi M, Fini M, Quaranta M, De Pasquale V, Raspanti M, Giavaresi G, Ottani V, Ruggeri A.** Crimp morphology in relaxed and stretched rat Achilles tendon. *J Anat* **2007**; 210: 1-7.

- [45] **Fratzl P, Misof K, Zizak I.** Fibrillar structure and mechanical properties of collagen. *J Struct Biol* **1997**; 122: 119-122.
- [46] **Fujimoto D, Ishida T, Hayashi H.** The structure of pyridonoline, a collagen cross-link. *Biochem Biophys Res Commun* **1978**; 84: 52-57.
- [47] **Fukuta S, Oyama M, Kavalovich K, Fu FH, Niyibizi C.** Identification of types II, IX and X collagens at the insertion of the bovine Achilles tendon. *Matrix Biol* **1998**; 17: 65-73.
- [48] **Galbraith CG, Sheetz MP.** Forces on adhesive contacts affect cell function. *Curr Opin Cell Biol* **1998**; 10: 566-571.
- [49] **Gathercole LJ, Keller A, Shah JA.** The periodic wave pattern in native tendon collagen: correlation of polarizing with scanning electron microscopy. *J Microsc* **1974**; 102: 95-106.
- [50] **Gathercole LJ, Keller A.** Crimp morphology in the fibre-forming collagens. *Matrix* **1991**; 11: 214-234.
- [51] **Graham HK, Holmes DF, Watson RB, Kadler KE.** Identification of collagen fibril fusion during vertebrate tendon morphogenesis. The process relies on unipolar fibrils and is regulated by collagen-proteoglycan interaction. *J Mol Biol* **2000**; 295: 891-902.
- [52] **Griffiths RI.** Shortening of muscle fibres during stretch of the active cat medial gastrocnemius muscle: the role of tendon compliance. *J Physiol* **1991**; 436: 219-236.
- [53] **Gutsmann T, Fantner GE, Venturoni M, Ekani-Nkodo A, Thompson JB, Kindt JH, Morse DE, Fygenon DK, Hansma PK.** Evidence that collagen fibrils in tendon are inhomogeneously structured in a tube-like manner. *Biophys J* **2003**; 84: 2593-2598.
- [54] **Hannafin JA, Arnoczky SP, Hoonjan A, Torzilli PA.** Effect of stress deprivation and cyclic tensile loading on the material and morphologic properties of canine flexor digitorum profundus tendon: an in vitro study. *J Orthop Res* **1995**; 13: 907-914.
- [55] **Hansen KA, Weiss JA, Barton JK.** Recruitment of tendon crimp with applied tensile strain. *J Biomech Eng* **2002** 124: 72-77.
- [56] **Hess GP, Cappiello WL, Poole RM, Hunter SC.** Prevention and treatment of overuse tendon injuries. *Sports Med* **1989**; 8: 371-384.
- [57] **Hodge AJ, Petruska JA.** Recent studies with the electron microscope on ordered aggregates of the tropocollagen molecule. In: Ramachandran , G.N. (Ed), *Aspects of Protein Structure*, Academic Press, New York **1963**; 289-300.
- [58] **Holmes DF, Chapman JA, Prockop DJ, Kadler, KE.** Growing tips of type I collagen fibrils formed in vitro are near-paraboloidal in shape, implying a

reciprocal relationship between accretion and diameter. *Proc Natl Acad Sci USA* **1992**; 89: 9855-9859.

- [59] **Holmes, D. F., Graham, H. K. and Kadler, K. E.** (1998). Collagen fibrils forming in developing tendon show an early and abrupt limitation in diameter at the growing tips. *J Mol Biol* **1998**; 283: 1049-1058.
- [60] **Houk JC, Singer JJ, Goldman MR.** Adequate stimulus for tendon organs to forces applied to muscle tendon. *J Neurophysiol* **1971**; 30: 466-481.
- [61] **Huijing PA, van Lookeren Campagne AA, Koper JF.** Muscle architecture and fibre characteristics of rat gastrocnemius and semimembranosus muscles during isometric contractions. *Acta Anat* **1989**; 135: 46-52.
- [62] **Hurschler C, Provenzano PP, Vanderby R Jr.** Scanning electron microscopic characterization of healing and normal rat ligament microstructure under slack and loaded conditions. *Connect Tissue Res* **2003**; 44: 59-68.
- [63] **Hynes RO.** Integrins: versatility, modulation and signalling in cell adhesion. *Cell* **1992**; 69: 11-25.
- [64] **Ingber DE.** Integrins as mechanochemical transducers. *Curr Opin Cell Biol* **1991**; 3: 841-848.
- [65] **Ingber DE.** Integrins, tensegrity, and mechanotransduction. *Gravit Space Biol Bull* **1997**; 10: 49-55.
- [66] **Ingber DE.** Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *J Cell Sci* **2003a**; 116:1157-73.
- [67] **Ingber DE.** Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks. *J Cell Sci* **2003b**; 116:1397-408.
- [68] **Ippolito E, Natali PG, Postacchini F, Accinni L, Demartino C.** Morphological, immunochemical and biochemical study of rabbit Achilles tendon at various ages. *J Bone Joint Surg (Am)* **1980**; 62: 583-592.
- [69] **Jackson DS.** Chondroitin sulphuric acid as a factor in the stability of tendon. *J Biochem* **1953**; 54: 638-641.
- [70] **Jami L.** Golgi tendon organs in mammalian skeletal muscle: functional properties and central actions. *Physiol Rev* **1992**; 72: 623-666.
- [71] **Järvinen TA, Järvinen TL, Kannus P, Jozsa L, Järvinen M.** Collagen fibres of the spontaneously ruptured human tendons display decreased thickness and crimp angle. *J Orthop Res* **2004**; 22: 1303-1309.
- [72] **Jepsen KJ, Wu F, Peragallo JH, Paul J, Roberts L, Ezura Y, Oldberg A, Birk DE, Chakravarti S.** A syndrome of joint laxity and impaired joint integrity in lumican- and fibromodulin-deficient mice. *J Biol Chem* **2002**; 277:35532-35540.

- [73] **Jozsa L, Balint BJ.** The architecture of human tendons. The peritenonium and so-called surface phenomenon. *Traumatologia* **1978**; 21: 293-297.
- [74] **Jozsa L, Balint BJ, Reffy A, Demel Z.** Histochemical and ultrastructural study of adult human tendon. *Acta Histochem* **1979**; 65: 250-257.
- [75] **Jozsa L, Kannus P, Balint JB, Reffy A.** Three-dimensional ultrastructure of human tendons. *Acta Anat* **1991**; 142: 306–312.
- [76] **Jozsa L, Kannus P.** Histopathological findings in spontaneous tendon ruptures. *Scand J Med Sci Sports* **1997**; 7: 113–118.
- [77] **Jozsa L, Kannus P.** Structure and metabolism of normal tendons. In: Jozsa L, Kannus P, eds. *Human tendons: anatomy, physiology and pathology*. Champaign: Human Kinetics **1997**; 46-95.
- [78] **Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR.** Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* **1979**; 11: 447-55.
- [79] **Kandel ER, Swartz JH.** Principles of neural science. Elsevier Ed. New York, **1981**.
- [80] **Kannus P.** Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports* **2000**; 10: 312–320.
- [81] **Kastelic J, Baer E.** Deformation in tendon collagen. *Symp Soc Exp Biol* **1980**; 34: 397-435.
- [82] **Kastelic J, Galeski A, Baer E.** The multicomposite structure of tendon. *Connect Tissue Res* **1978**; 6: 11-23.
- [83] **Kastelic J, Palley I, Baer E.** A structural mechanical model for tendon crimping. *J Biomech* **1980**; 13: 887–893.
- [84] **Kirkendall DT, Garrett WE.** Function and biomechanics of tendons. *Scand J Med Sci Sports* **1997**; 7: 62-66.
- [85] **Knott L, Bailey AJ.** Collagen cross-links in mineralizing tissues: a review of their chemistry, function and clinical relevance. *Bone* **1998**; 22: 181-187.
- [86] **Kubo K, Kanehisa H, Kawakami Y, Fukunaga T.** Influence of static stretching on viscoelastic properties of human tendon structures in vivo. *J Appl Physiol* **2001**; 90: 520-527.
- [87] **Kumar CC.** Signaling by integrin receptors. *Oncogene* **1998**; 17:1365-73.
- [88] **Kvist M, Jozsa L, Jarvinen M, Kvist H.** Fine structural alterations in chronic Achilles paratenonitis in athletes. *Pathol Res Pract* **1985**; 180: 416-423.



- [89] **Leblond CP.** Synthesis and secretion of collagen by cells of connective tissue, bone and dentine. *Anat Rec* **1989**; 224: 123-138.
- [90] **Magnusson SP, Hansen P, Kjaer M.** Tendon properties in relation to muscular activity and physical training. *Scand J Med Sci Sports* **2003a**; 13: 211–223.
- [91] **Magnusson SP, Hansen P, Aagaard P, Brønd J, Dyhre-Poulsen Bojsen-Møller J, Kjaer M.** Differential strain patterns of the human gastrocnemius aponeurosis and free tendon, in vivo. *Acta Physiol Scand* **2003b**; 177: 185–195.
- [92] **Magnusson SP, Qvortrup K, Larsen JO, Rosager S, Hanson P, Aagaard P, Krogsgaard M, Kjaer M.** Collagen fibril size and crimp morphology in ruptured and intact Achilles tendons. *Matrix Biol* **2002**; 21: 369–377.
- [93] **Marchini M, Morocutti M, Ruggeri A, Koch MHJ, Bigi A, Roveri N.** Differences in the fibril structure of corneal and tendon collagen. An electron microscopy and X-ray diffraction investigation. *Connect Tissue Res* **1986**; 15: 269-281.
- [94] **McCormick RJ.** Extracellular modifications to muscle collagen: implications for meat quality. *Poultry Sci* **1999**; 8: 785-791.
- [95] **Merrilees MJ, Flint MH.** Ultrastructural study of tension and pression zones in a rabbit flexor tendon. *Am J Anat* **1980**; 157: 87-106.
- [96] **Minns RJ, Soden PD, Jackson DS.** The role of the fibrous components and ground substance in the mechanical properties of biological tissues: a preliminary investigation. *J Biomech* **1973**; 6: 153-165.
- [97] **Monnier VM, Cerami A.** Non-enzymatic browning in vivo: a possible process for aging for long-lived proteins. *Science* **1981**; 211: 491-493.
- [98] **Moore JC.** The Golgi tendon organ and the muscle spindle. *Am J Occup Ther* **1974**; 28: 415-20.
- [99] **Moore JC.** The Golgi tendons organs: a review and update. *Am J Occup Ther* **1984**; 38: 227-236.
- [100] **Moore MJ, De Beaux A.** A quantitative ultrastructural study of rat tendon from birth to maturity. *J Anat* **1987**; 153: 163-169.
- [101] **Mosler, E., Folkhard W., Knorzer E., Nemetschek-Gansler H., Nemetschek T.** Stress-induced molecular rearrangement in tendon collagen. *J Mol Biol* **1985**; 182: 589-596.
- [102] **Muramatsu T, Muraoka T, Takeshita D, Kawakami Y, Hirano Y, Fukunaga T.** Mechanical properties of tendon and aponeurosis of human gastrocnemius muscle in vivo. *J Appl Physiol* **2001**; 90: 1671–1678.
- [103] **Niven H, Baer E, Hiltner A.** Organization of collagen fibers in rat tail tendon at the optical microscope level. *Coll Relat Res* **1982**; 2: 131–142.

- [104] **Ochiai N, Matsui T, Miyaji N, Merklin RJ, Hunter JM.** Vascular anatomy of flexor tendons. I. Vincular system and blood supply of the profundus tendon in the digital sheath. *J Hand Surg Am* **1979**; 4: 321-330.
- [105] **O' Brien M.** Structure and metabolism of tendons. *Scand J Med Sci Sports* **1997**; 7: 55-61.
- [106] **Ottani V, Raspanti M, Ruggeri A.** Collagen structure and functional implications. *Micron* **2001**; 32: 251-260.
- [107] **Parry DA, Barnes GRG, Craig AS.** A comparison of the size distribution of collagen fibrils in connective tissues as a function of age and a possible relation between fibril size distribution and mechanical properties. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **1978**; 203: 305-321.
- [108] **Partington FR, Wood GC.** The role of non-collagen components in the mechanical behaviour of tendon fibres. *Biochim Biophys Acta* **1963**; 69: 485-495.
- [109] **Patterson-Kane JC, Firth EC, Goodship AE, Parry DA.** Age-related differences in collagen crimp patterns in the superficial digital flexor tendon core region of untrained horses. *Aust Vet J* **1996**; 75: 39-44.
- [110] **Patterson-Kane JC, Parry DA, Birch HL, Goodship AE, Firth EC.** An age-related study of morphology and cross-link composition of collagen fibrils in the digital flexor tendons of young thoroughbred horses. *Connect Tissue Res* **1997**; 36: 253-260.
- [111] **Patterson-Kane JC, Wilson AM, Firth EC, Parry DA, Goodship AE.** Exercise-related alterations in crimp morphology in the central regions of superficial digital flexor tendons from young thoroughbreds: a controlled study. *Equine Vet J* **1998**; 30: 61-64.
- [112] **Perugia L, Postacchini F, Ippolito E.** I tendini, biologia-patologia-clinica. Masson Italia Editori, Milano **1981**.
- [113] **Pins GD, Christiansen DL, Patel R, Silver FH.** Self-assembly of collagen fibers. Influence of fibrillar alignment and decorin on mechanical properties. *Biophys J* **1997**; 73: 2164-72.
- [114] **Purslow PP, Wess T J, Hukins DWL.** Collagen orientation and molecular spacing during creep and stress-relaxation in soft connective tissues. *J Exp Biol* **1998**; 201: 135-142.
- [115] **Raspanti M, Franchi M, Quaranta M, De Pasquale V, Ottani V, Dell' Orbo C, Ruggeri A.** Different crimp patterns in collagen fibrils are related to the subfibrillar architecture. **2007** (*in press*).
- [116] **Raspanti M, Manelli A, Franchi M, Ruggeri A.** The 3D structure of crimps in the rat Achilles tendon. *Matrix Biol* **2005**; 24: 503-507.

- [117] **Reale E, Benazzo F, Ruggeri A.** Differences in the microfibrillar arrangement of collagen fibrils. Distribution and possible significance. *J Submicrosc Cytol* **1981**; 13: 135-143.
- [118] **Rigby BJ, Hirai N, Spikes JD, Eyring H.** The mechanical properties of rat tail tendon. *J Gen Physiol* **1959**; 43: 265–283.
- [119] **Robins SP, Bailey AJ.** Age-related changes in collagen: the identification of reducible lysine-carbohydrate condensation products. *Bioche Biophys Res Commun* **1972**; 48: 76-84.
- [120] **Robbins JR, Vogel KG.** Regional expression of mRNA for proteoglycans and collagen in tendon. *Eur J Cell Biol* **1994**; 64: 264-270.
- [121] **Robbins JR, Evanko SP, Vogel KG.** Mechanical loading and TGF-, regulate proteoglycan synthesis in tendon. *Arch Biochem Biophys* **1997**; 342: 203-211.
- [122] **Rosager S, Aagaard P, Dyhre-Poulsen P, Neergaard K, Kjaer M, Magnusson SP.** Load-displacement properties of the human triceps surae aponeurosis and tendon in runners and non-runners. *Scand J Med Sci Sports* **2002**; 12: 90-98.
- [123] **Rowe RW.** The structure of rat tail tendon. *Connect Tissue Res* **1985a**; 14: 9-20.
- [124] **Rowe RW.** The structure of rat tail tendon fascicles. *Connect Tissue Res* **1985b**; 14: 21-30.
- [125] **Ruggeri A, Benazzo F, Reale E.** Collagen fibrils with straight and helicoidal microfibrils: a freeze-fracture and thin-section study. *J Ultrastruct Res* **1979**; 68: 101-108.
- [126] **Sarkar SK, Hiyama Y, Niu CH, Young PE, Gerig JT, Torchia DA.** Molecular dynamics of collagen side chains in hard and soft tissues. A multinuclear magnetic resonance study. *Biochemistry* **1987**; 26: 6793-6800.
- [127] **Sasaki N, Odajima S.** Elongation mechanism of collagen fibrils and force-strain relations of tendon at each level of structural hierarchy. *J Biomech* **1996**; 29: 1131-6.
- [128] **Sasaki N, Odajima S.** Stress-strain curve and Young's modulus of a collagen molecule as determined by the X-ray diffraction technique. *J Biomech* **1996**; 29: 655-8.
- [129] **Schatzker J, Branemark PI.** Intravital observations on the microvascular anatomy and microcirculation of the tendon. *Acta Orthop Scand Suppl* **1969**; 126 :1-23.
- [130] **Schoultz TW, Swett JE.** The fine structure of the Golgi tendon organ. *J Neurocytol* **1972**; 1: 1–26.
- [131] **Schoultz TW, Swett JE.** Ultrastructural organization of the sensory fibers innervating the Golgi tendon organ. *Anat Rec* **1974**; 179 :147-62.

- [132] **Scott JE.** Elasticity in extracellular matrix shape modules of tendon, cartilage, etc. A sliding proteoglycan–filament model. *J Physiol* **2003**; 553:335–343.
- [133] **Scott JE, Parry AD.** Control of collagen fibril diameters in tissues. *Int J Biol Macromol* **1992**; 14: 292-3.
- [134] **Scott JE.** Proteoglycan: collagen interactions in connective tissues. Ultrastructural, biochemical, functional and evolutionary aspects. *Int J Biol Macromol* **1991**; 13: 157-61.
- [135] **Scott JE, Orford CR, Hughes EW.** Proteoglycan–collagen arrangements in developing rat tail tendon. An electron microscopical and biochemical investigation. *J Biochem* **1981**; 195: 573–581.
- [136] **Scott SH, Loeb GE.** Mechanical properties of aponeurosis and tendon of the cat soleus muscle during whole-muscle isometric contractions. *J Morph* **1995**; 224: 73–86.
- [137] **Screen HR, Bader DL, Lee DA, Shelton JC.** Local strain measurement within tendon. *Strain* **2004a**; 40:157-163.
- [138] **ScreenHR, Lee DA, Bader DL, Shelton JC.** An investigation into the effects of the hierarchical structure of tendon fascicles on micromechanical properties. *Proc Inst Mech Eng [H]* **2004b**; 218: 109–119.
- [139] **Sell DR, Monnier VM.** Structure elucidation of a senescence crosslink from human extracellular matrix: implications of pentoses in the aging process. *J Biol Chem* **1989**; 264: 21597-21602.
- [140] **Shah JS, Palacios E, Palacios L.** Development of crimp morphology and cellular changes in chick tendons. *Dev Biol* **1982**; 94: 499-504.
- [141] **Silver FH, Freeman JW, Seehra GP.** Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical poperties. *J Biomech* **2003**; 36: 1529-1553.
- [142] **Smith BL, Schaffer TE, Viani M, Thompson JB, Frederick NA, Kindt J, Belcher A, Stucky GD, Morse DE, Hansma PK.** Molecular mechanistic origin of the toughness of natural adhesives, fibres and composites. *Nature* **1999**; 399: 761-763.
- [143] **Stilwell DL Jr.** The innervation of tendon and aponeuroses. *Am J Anat* **1957**; 100: 289-317.
- [144] **Stolinski C.** Disposition of collagen fibrils in human tendons. *J Anat* **1995**; 186: 577-83
- [145] **Strocchi R, Leonardi L, Guizzardi S, Marchini M, Ruggeri A.** Ultrastructural aspects of rat tail tendon sheaths. *J Anat* **1985**; 140: 57-67.

- [146] **Stromberg DD, Wiederhielm CA.** Viscoelastic description of a collagenous tissue in simple elongation. *J Appl Physiol* **1969**; 26: 857–862.
- [147] **Stuart DG, Goslow GE, Mosher CG, Reinking RM.** Stretch responsiveness of Golgi tendon organs. *Exp Brain Res* **1970**; 10 :463–476.
- [148] **Swett JE, Schoultz TW.** Mechanical transduction in the Golgi tendon organ: a hypothesis. *Arch Ital Biol* 1975; 113: 374-82.
- [149] **Torp S, Baer E, Friedman B.** Effects of age and of mechanical deformation on the ultrastructure of tendon. In *Structure of Fibrous Biopolymers*, Coston papers No. 26, E. D. T. Atkins and A. Keller editors, Butterworths, London **1975**; 223-250.
- [150] **Thompson JB, Kindt JH, Drake B, Hansma HG, Morse DE, Hansma PK.** Bone indentation recovery time correlates with bond reforming time. *Nature* **2001**; 414: 773-776.
- [151] **Trelstad RL, Hayashi K.** Tendon collagen fibrillogenesis: intracellular subassemblies and cell surface changes associated with fibril growth. *Dev Biol* **1979**; 71: 228-242.
- [152] **Tuderman L, Kivirikki KI, Prockop DJ.** Partial purification and characterization of a neutral protease which cleaves the N-terminal propeptides from procollagen. *Biochemistry* **1977**; 16: 3421-3429.
- [153] **Valhmu WB, Stazzone EJ, Bachrach NM, Saed-Nejad F, Fischer SG, Mow VC, Ratcliffe A.** Load-controlled compression of articular cartilage induces a transient stimulation of aggrecan gene expression. *Arch Biochem Biophys* **1998**; 353: 29-36.
- [154] **Vertel BM, Ratcliffe A.** Aggrecan. In: Iozzo R (ed) *Proteoglycans*. Marcel Dekker **2000**; 343-377.
- [155] **Viidik A, Ekholm R.** Light and electron microscopic studies of collagen fibers under strain. *Z Anat Entwicklungsgesch* **1968**; 121: 154–164.
- [156] **Viidik A.** Simultaneous mechanical and light microscopic studies of collagen fibers. *Z Anat Entwicklungsgesch* **1972**; 136: 204–212.
- [157] **Viidik A, Danielsen CC, Oxlund H.** On fundamental and phenomenological models, structure and mechanical properties of collagen, elastin and glycosaminoglycan complexes. *Biorheology* **1982**; 19: 437-451.
- [158] **Viidik A.** Tendons and ligaments. In: Comper, W.D. (Ed), *Extracellular Matrix. Tissue Function*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam **1996**; 1:303-327.
- [159] **Viidik A, Nielsen HM, Skalicky M.** Influence of physical exercise on aging rats. II. Life-long exercise delays aging of tail tendon collagen. *Mech Ageing Dev* **1996**; 88: 139–148.

- [160] **Vitagliano L, Berisio R, Mazzarella L, Zagari A.** Structural bases of collagen stabilization induced by proline hydroxylation. *Biopolymers* **2001**; 58: 459-464.
- [161] **Vogel KG.** What happens when tendons bend and twist? *Proteoglycans. J Musculoskelet Neuronal Interact* **2004**; 4: 202-3.
- [162] **Vogel KG, Evanko SP.** Proteoglycans of fetal bovine tendon. *J Biol Chem* **1987**; 262:13607-13613.
- [163] **Vogel KG, Heinegård D.** Characterization of proteoglycans from adult bovine tendon. *J Biol Chem* **1985**; 260: 9298-9306.
- [164] **Vogel KG, Trotter JA.** The effect of proteoglycans on the morphology of collagen fibrils formed in vitro. *Coll Relat Res* **1987**; 7: 105-14.
- [165] **Waggett AD, Ralphs JR, Kwan APL, Woodnutt D, Benjamin M.** Characterization of collagens and proteoglycans at the insertion of the human Achilles tendon. *Matrix Biol* **1998**; 16: 457-470.
- [166] **Wang JH.** Substrate deformation determines actin cytoskeleton reorganization: a mathematical modeling and experimental study. *J Theor Biol* **2000**; 202: 33-41.
- [167] **Wang JH.** Mechanobiology of tendon. *J Biomech* **2006**; 39: 1563-1582.
- [168] **Watanabe H, Yamada Y, Kimata K.** Roles of aggrecan, a large chondroitin sulphate proteoglycan, in cartilage structure and function. *J Biochem* **1998**; 124: 687-693.
- [169] **Watson RB, Holmes DF, Graham HK, Nussgens BV, Kadler KE.** Surface located procollagen N-propeptides on dermatosparactic collagen fibrils are not cleaved by procollagen N-proteinase and do not inhibit binding of decorin to the fibril surface. *J Mol Biol* **1998**; 278: 195-204.
- [170] **Wilmink J, Wilson AM, Goodship AE.** Functional significance of the morphology and micromechanics of collagen fibres in relation to partial rupture of the superficial digital flexor tendon in racehorses. *Res Vet Sci* **1992**; 53: 354-9.
- [171] **Wolff J.** Das Gesetz der Transformation der inneren Architektur der Knochen bei pathologischen Veränderungen der äußeren Knochenform. *Sitzungsber. Preuss. Akad. Wiss* **1884**; 22: 179.
- [172] **Wood TO, Cooke PH, Goodship AE.** The effect of exercise and anabolic steroids on the mechanical properties and crimp morphology of the rat tendon. *Am J Sports Med* **1998**; 16: 153-158.
- [173] **Yamauchi M, Chandler GS, Tanzawa H, Katz EP.** Cross-linking and the molecular packing of corneal collagen. *Biochem Biophys Res Commun* **1996**; 219: 311-315.
- [174] **Yoon JH, Halper J.** Tendon proteoglycans: biochemistry and function. *J Musculoskelet Neuronal Interact* **2005**; 5: 22-34.

## **ICONOGRAFIA**



Figura 1 - Il tutore in resina impiegato per indurre lo stiramento del tendine calcaneale nei ratti.



Figura 2 - Il tendine calcaneale, ancora in tensione nel tutore, viene esposto chirurgicamente, isolato e fissato in situ.



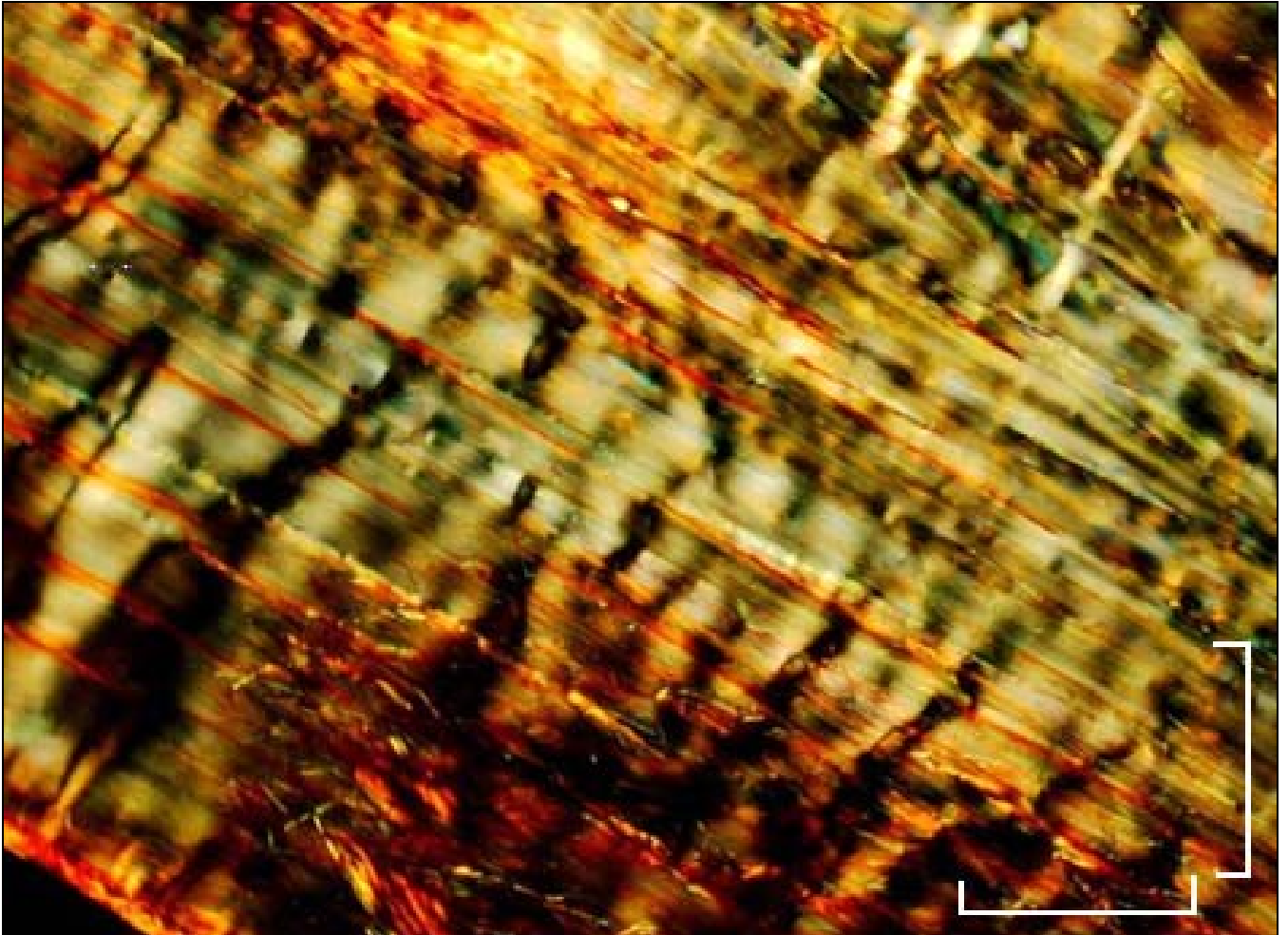


Figura 3 - Microscopia ottica a luce polarizzata: i tendini rilassati mostrano una periodica alternanza di bande chiare e scure di estinzione corrispondente ai crimps. Barra della scala = 100  $\mu\text{m}$

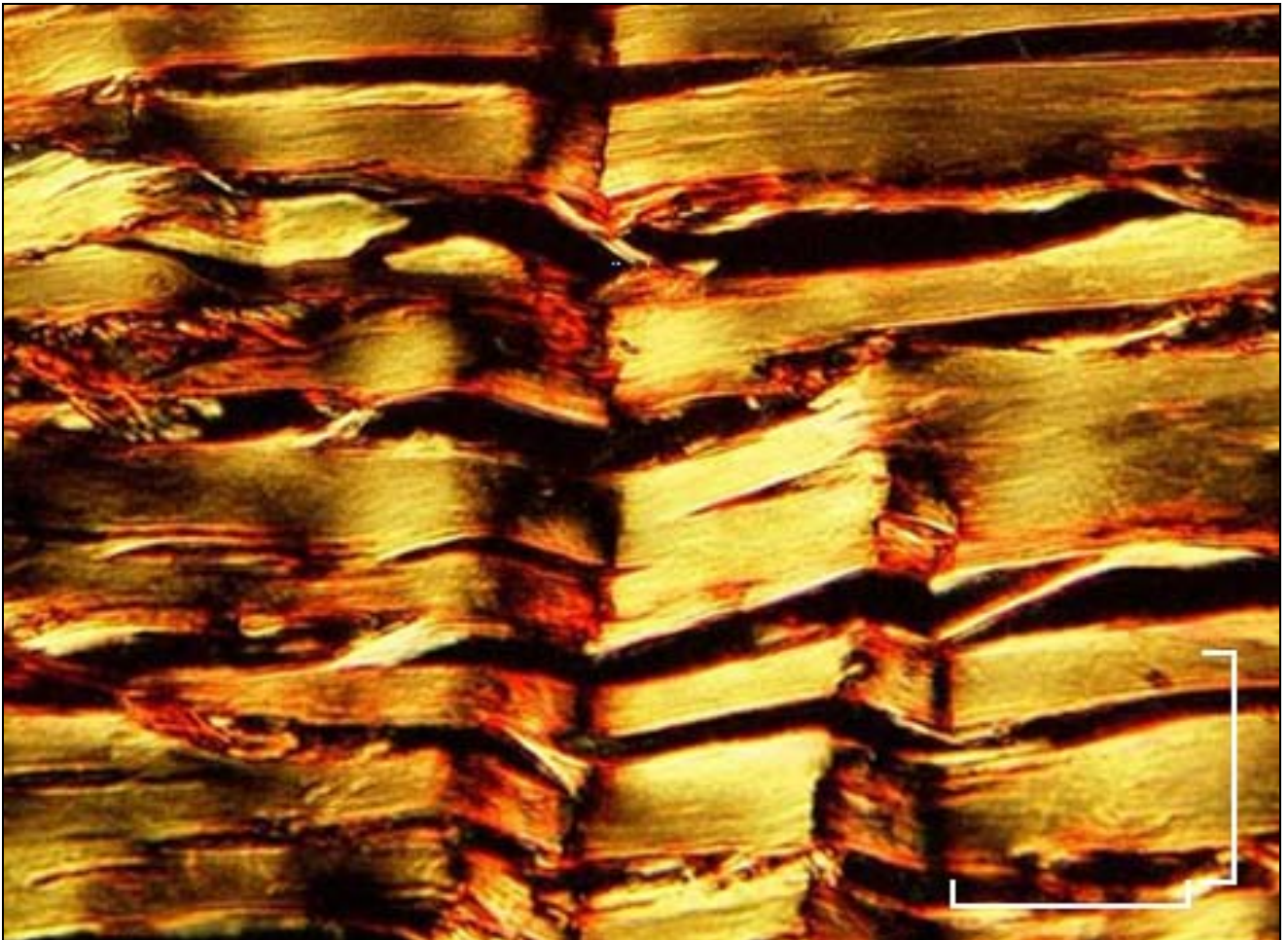


Figura 4 - Microscopia ottica a luce polarizzata: i crimps tendinei appaiono come triangoli isosceli o scaleni e mostrano variabilità nelle dimensioni e nell'ampiezza dell'angolo al vertice individuato dal piegamento dei fasci di fibre collagene. Barra della scala = 200  $\mu\text{m}$

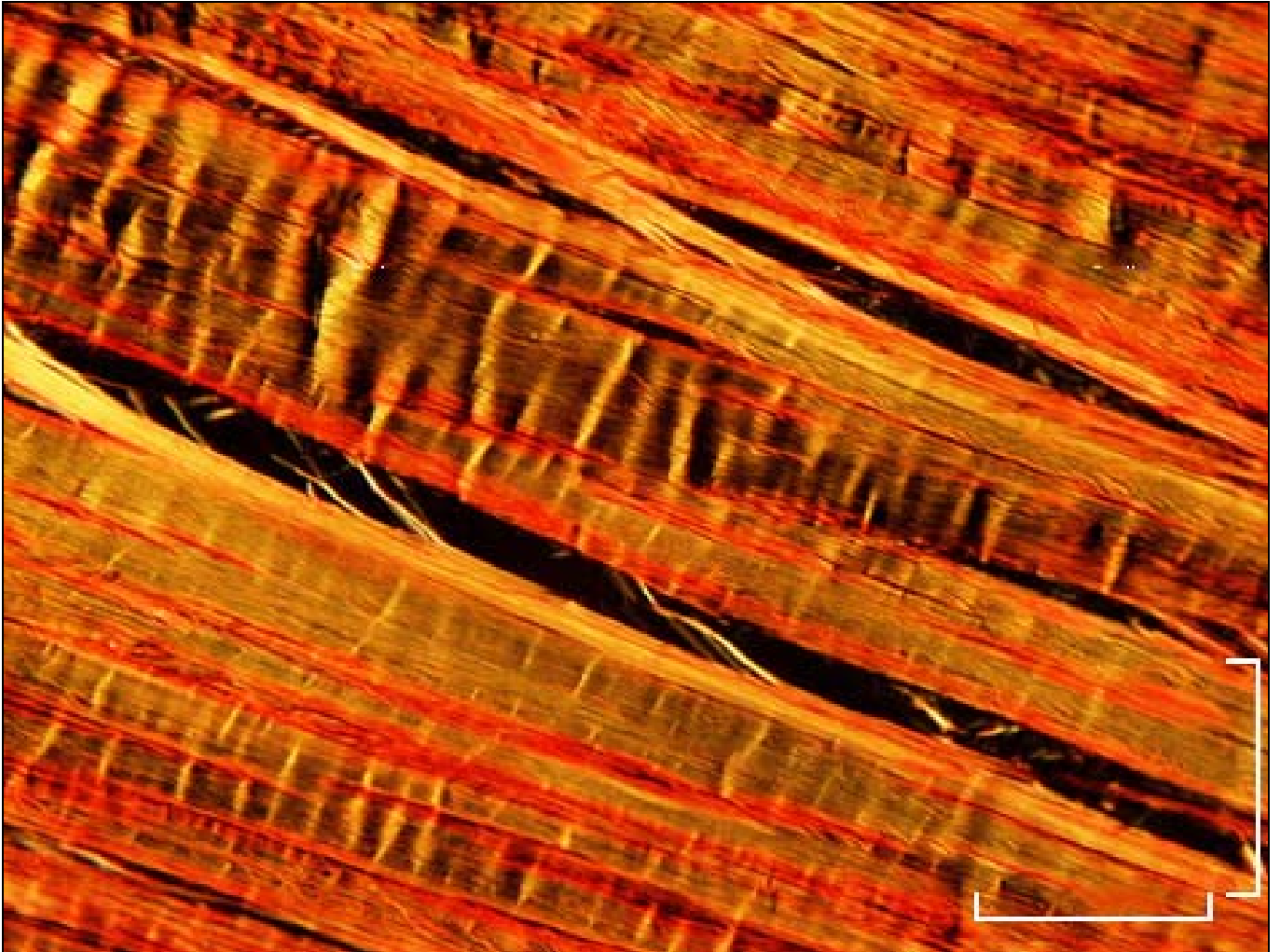


Figura 5 - Microscopia ottica a luce polarizzata: nei tendini sottoposti a stretching si osservano zone caratterizzate da fasci distesi e allineati lungo la direzione della forza applicata (assenza di bande di estinzione) e regioni nelle quali i crimps risultano ancora visibili ma appaiono appiattiti e parzialmente deformati. Barra della scala = 100  $\mu\text{m}$

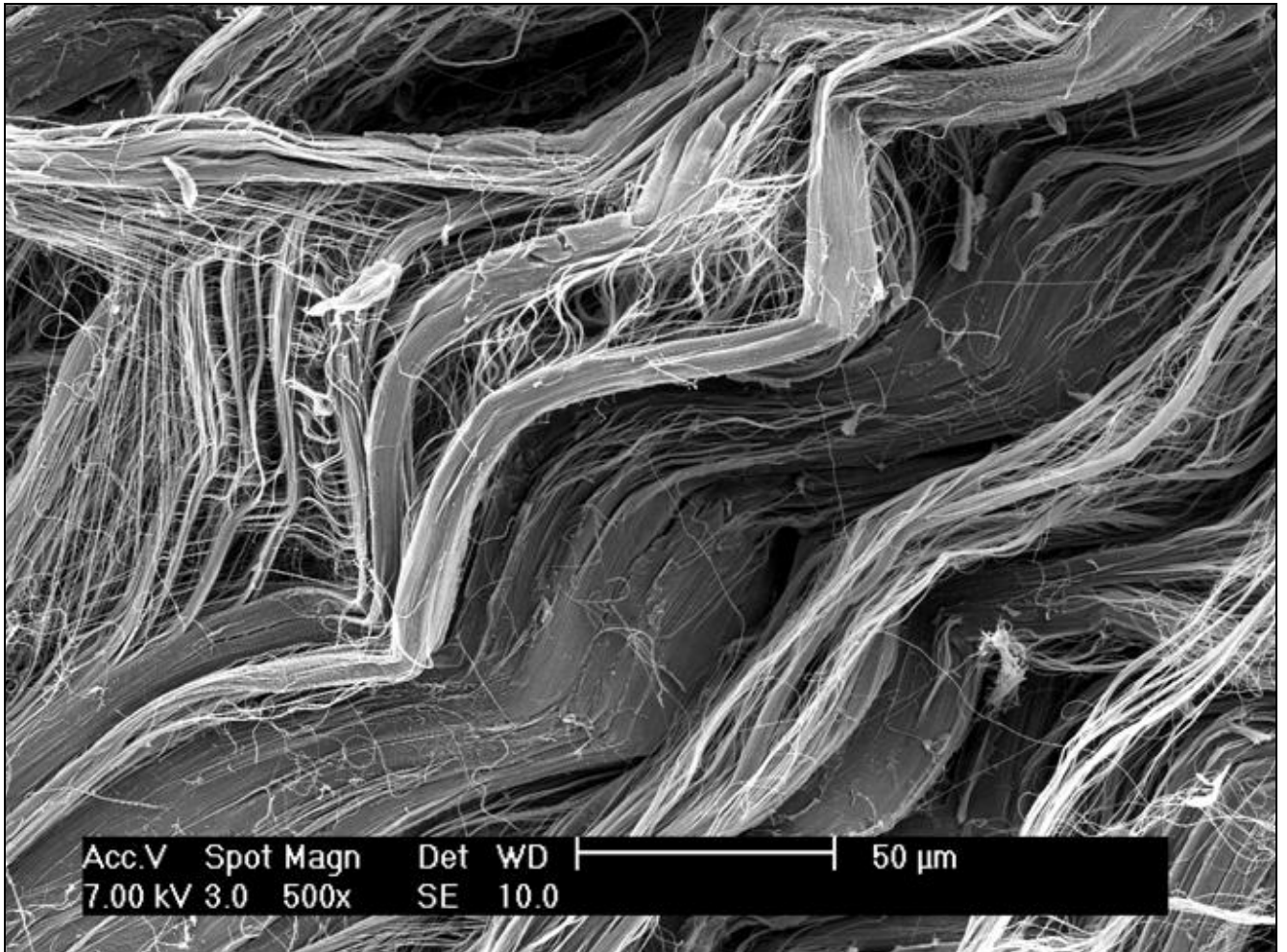


Figura 6 - Immagine a basso ingrandimento effettuata al SEM: nei tendini rilassati i fascicoli (fasci di fibre) seguono un evidente andamento a zig-zag planare e individuano crimps tendinei con un angolo molto accentuato. Barra della scala = 50  $\mu\text{m}$



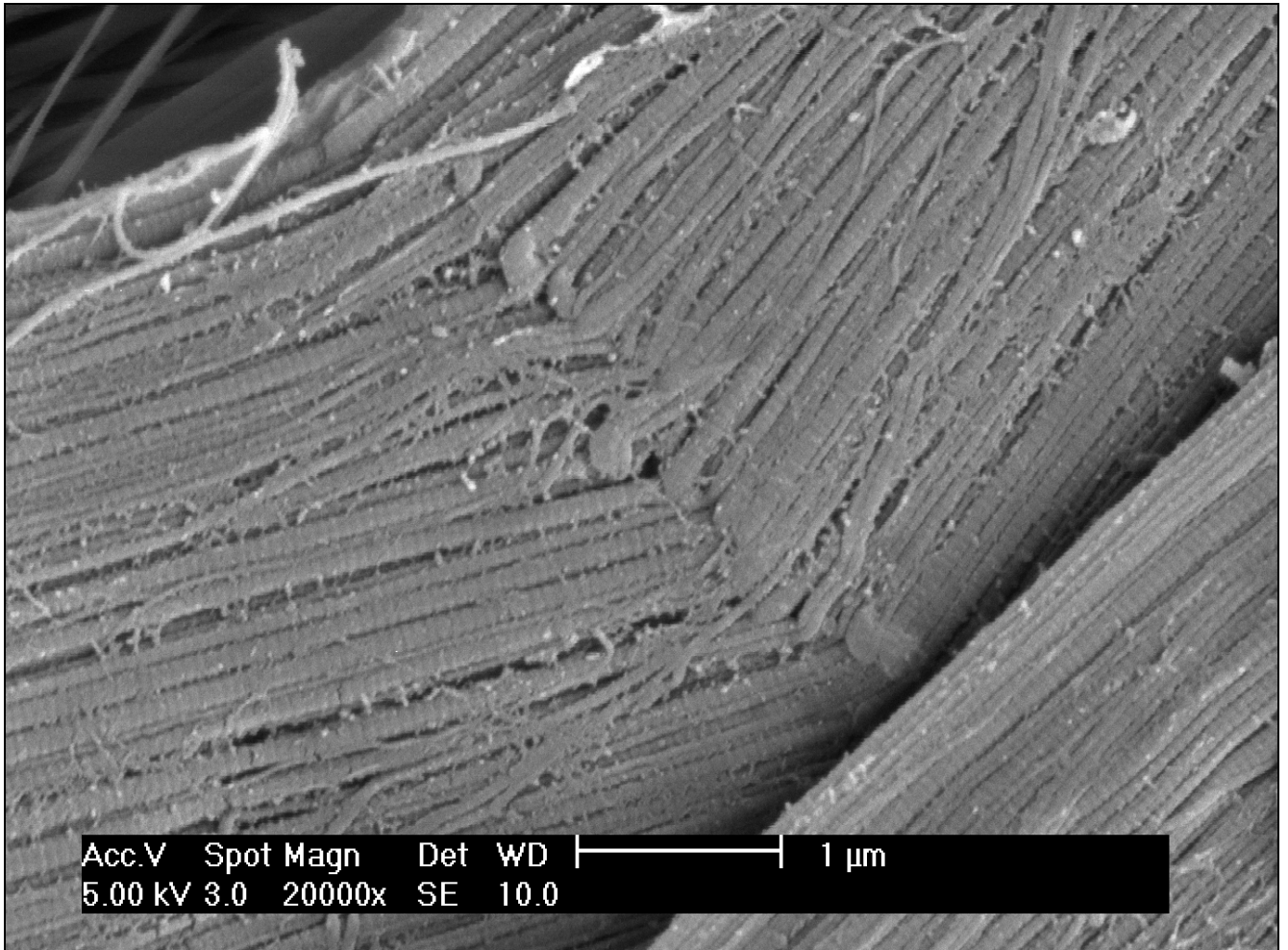


Figura 7 - Immagine a elevato ingrandimento effettuata al SEM di un tipico crimp tendineo: successivi segmenti fibrillari rettilinei risultano collegati da brusche discontinuità o cerniere in corrispondenza della quale tutte le fibrille cambiano simultaneamente direzione.

Barra della scala = 1 μm

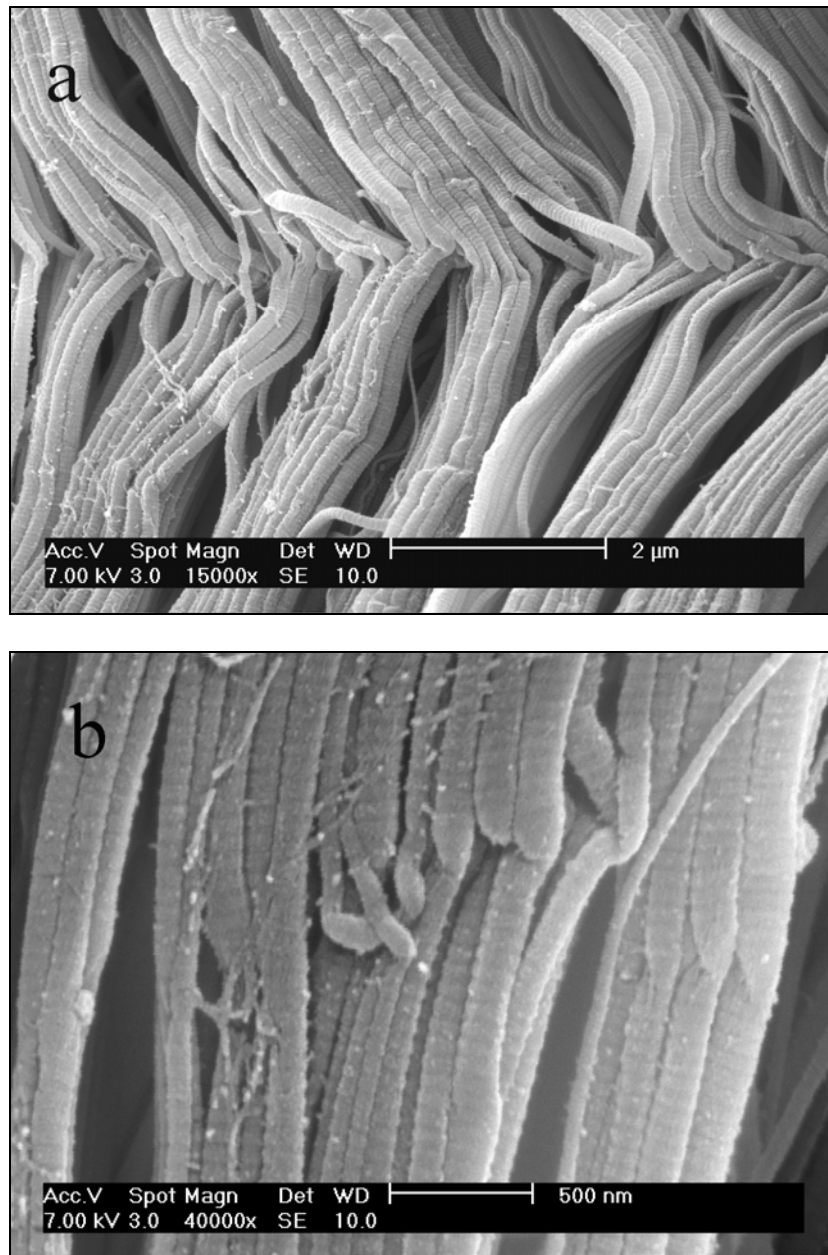


Figura 8 - Immagini a elevato ingrandimento effettuate al SEM: (a) le singole fibrille collagene cambiando bruscamente direzione, formano dei nodi denominati crimps fibrillari. Barra della scala = 2 µm. In (b) si può apprezzare la notevole variabilità morfologica dei crimps fibrillari: le fibrille appaiono parzialmente schiacciate, ritorte sul loro asse a guisa di baionetta oppure piegate e ritorte. Barra della scala = 500 nm

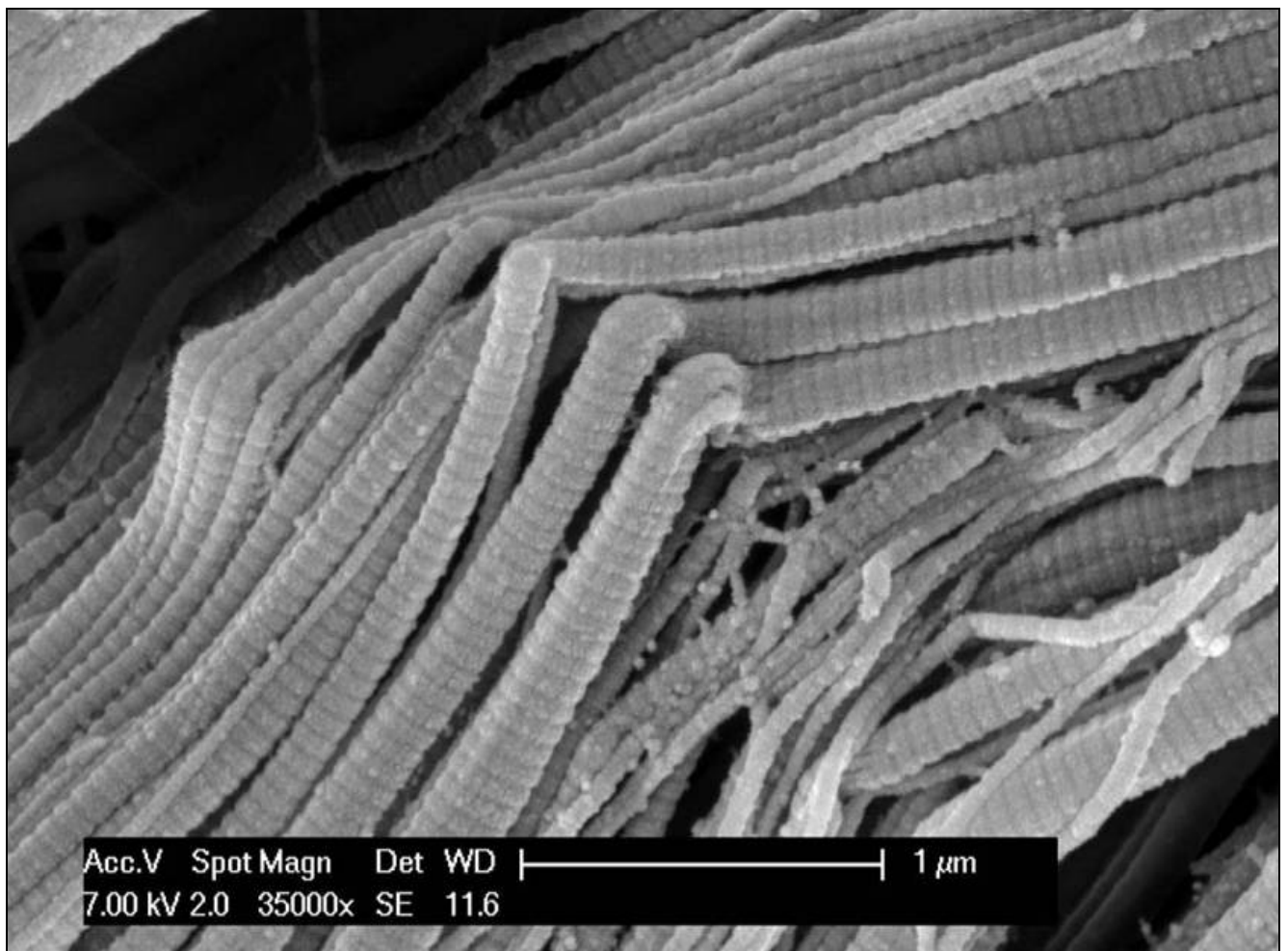


Figura 9 – Immagine a elevato ingrandimento effettuata al SEM: alcune fibrille collagene, nel punto di piegamento, non presentano il loro caratteristico periodo D. Barra della scala = 1 μm

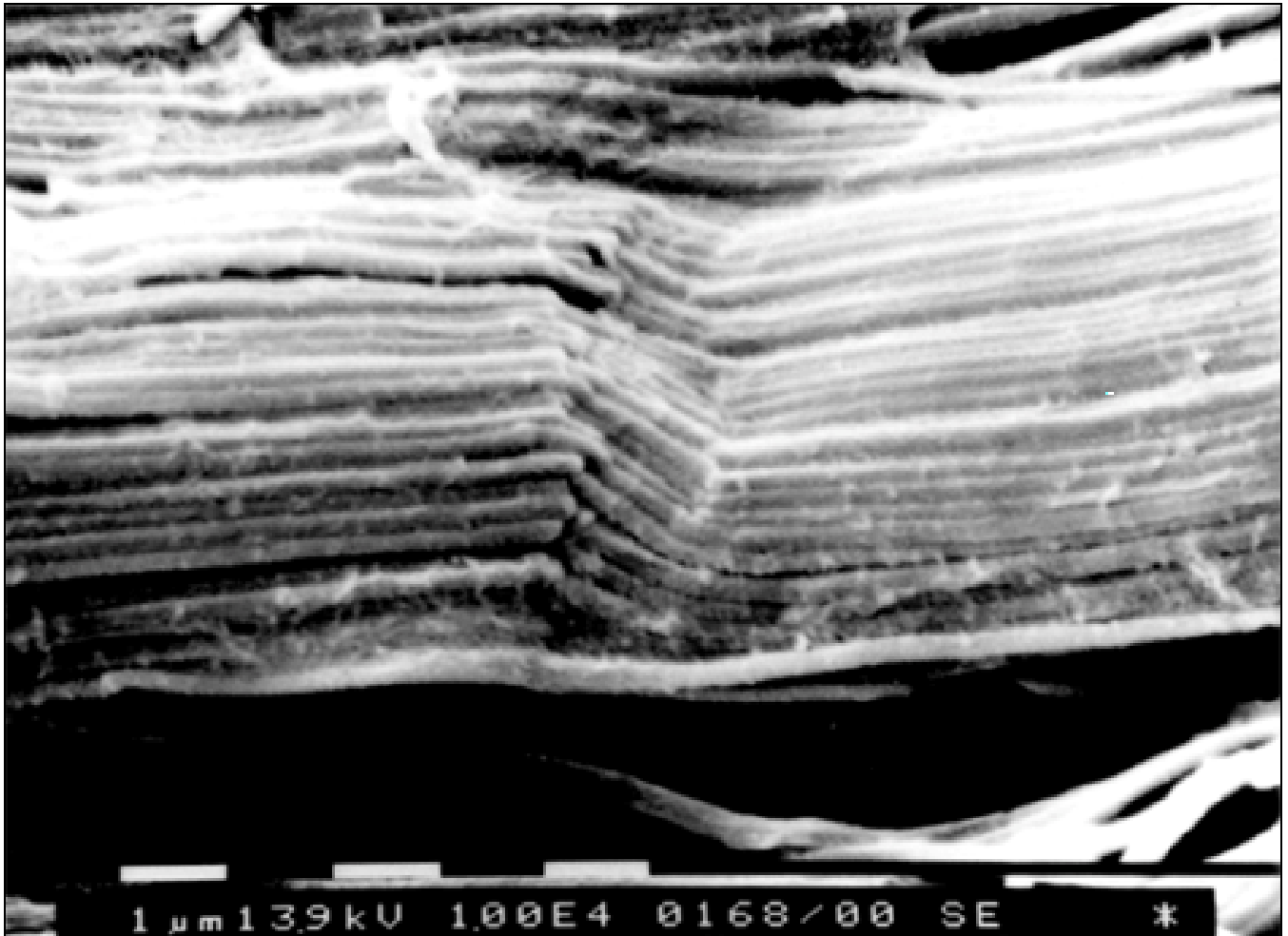


Figura 10 - Immagine a basso ingrandimento effettuata al SEM: i tendini sottoposti a stretching mostrano crimps appiattiti e parzialmente deformati; in corrispondenza della cresta del crimp sono ancora osservabili i crimps delle singole fibrille collagene. Barra della scala = 1  $\mu$ m



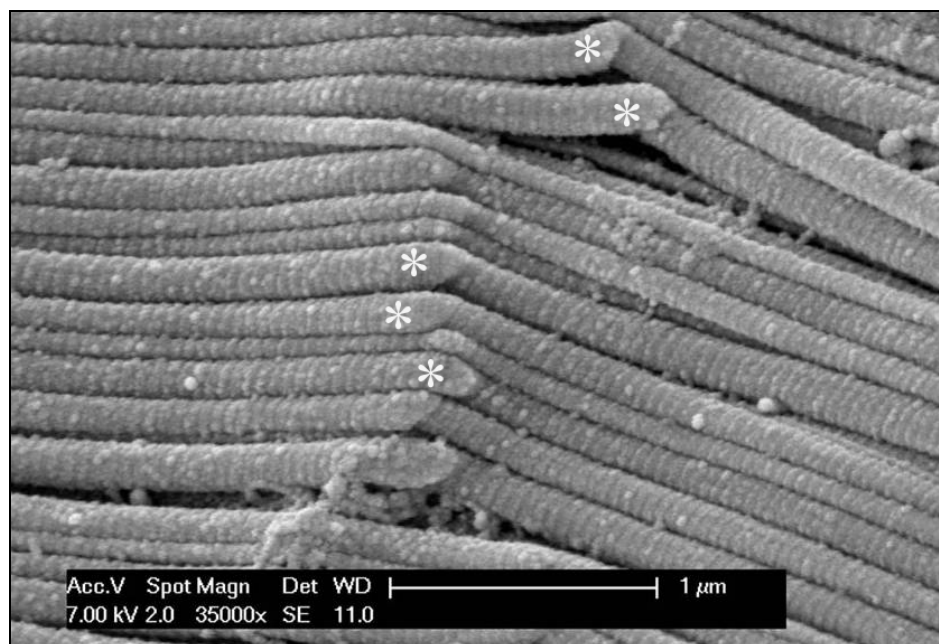
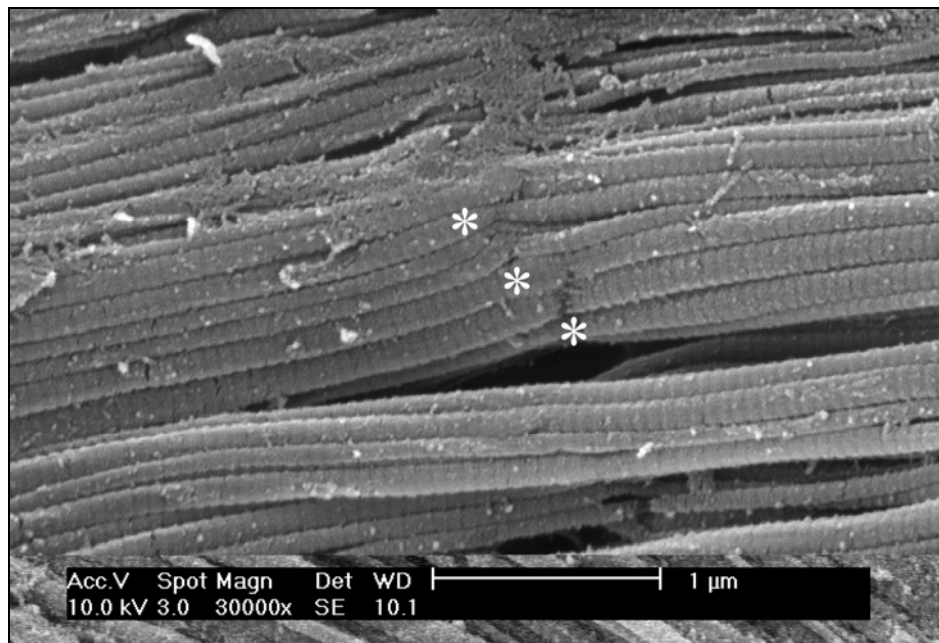


Figura 11 - Immagini a elevato ingrandimento effettuate al SEM: dopo stiramento, in alcune regioni del tendine i fasci di fibrille collagene appaiono completamente distesi e rettilinei (estinzione dei crimps tendinei); tuttavia le singole fibrille collagene conservano i loro crimps fibrillari (indicati dagli asterischi). Barra della scala = 1  $\mu\text{m}$

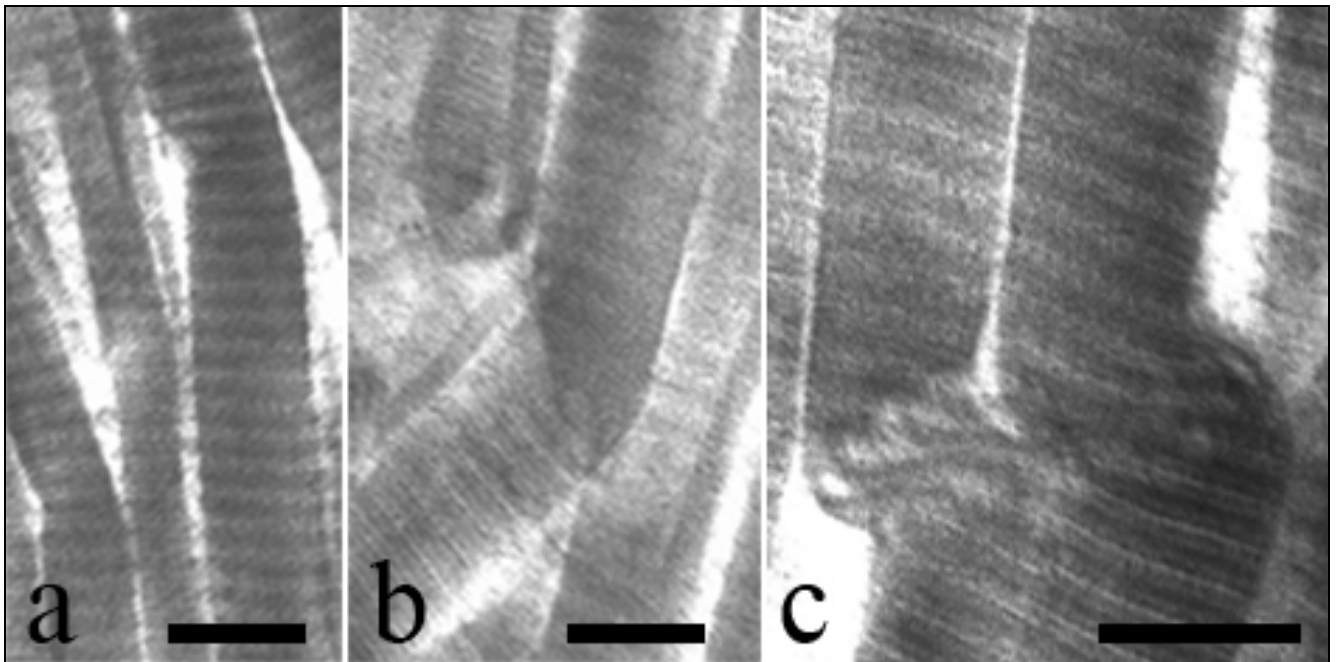


Figura 12 - Immagini a elevato ingrandimento ottenute al TEM: sono evidenziati i differenti aspetti ultrastrutturali dei crimps fibrillari nei tendini rilassati; in corrispondenza del crimp fibrillare le fibrille collagene perdono la loro forma cilindrica e mostrano peculiari patterns di piegamento: a) fibrilla piegata e schiacciata; b) fibrilla piegata a guisa di baionetta; c) fibrilla ritorta e piegata. Alcune fibrille (c), nel punto di piegamento, non esibiscono il caratteristico bandeggio periodico D e mostrano un'alterato arrangiamento microfibrillare. Barra della scala = 250 nm

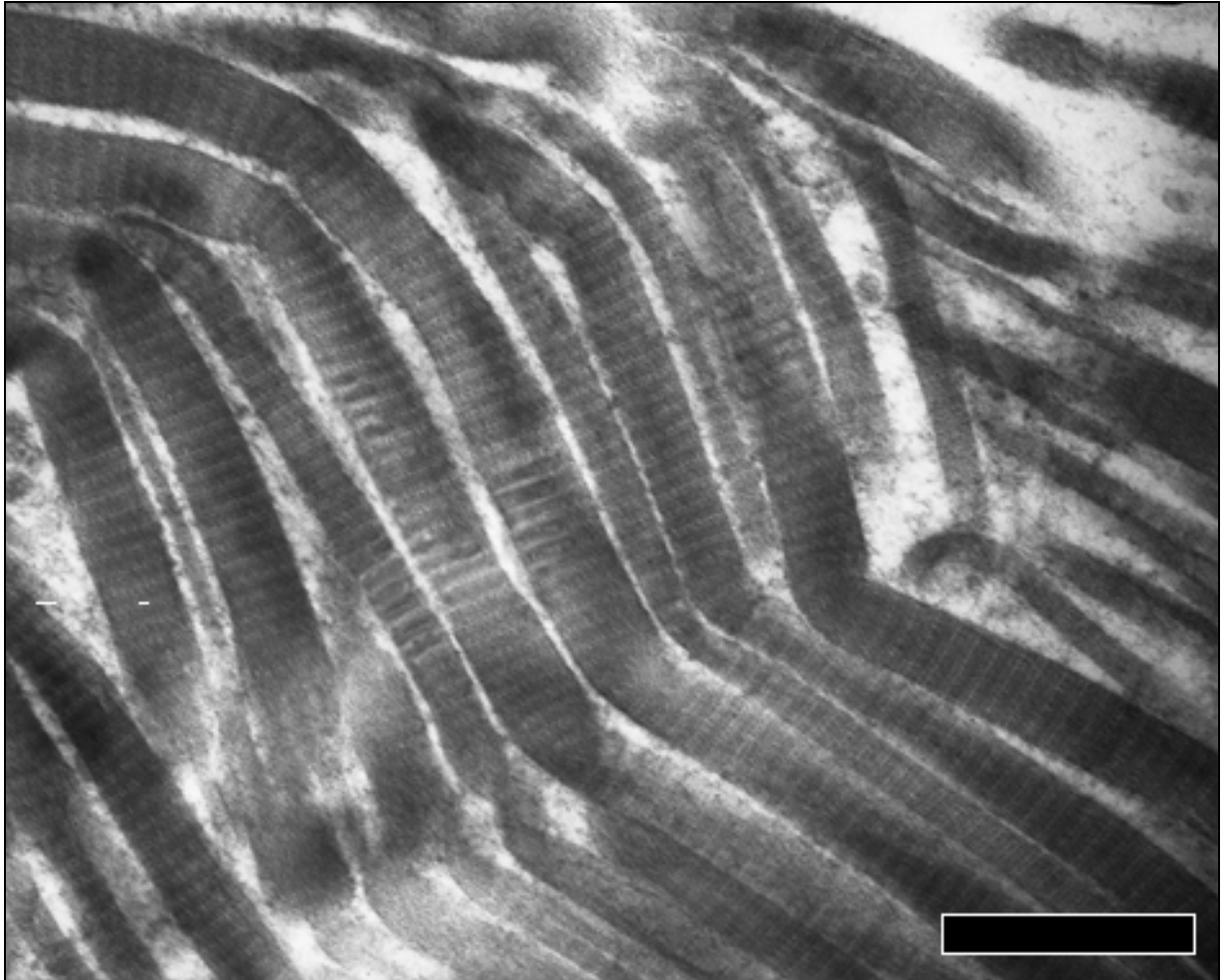


Figura 13 - Immagine a elevato ingrandimento ottenuta al TEM: ogni crimp tendineo include più crimps fibrillari e le singole fibrille collagene mostrano crimps fibrillari multipli lungo la loro estensione. Barra della scala = 1  $\mu\text{m}$

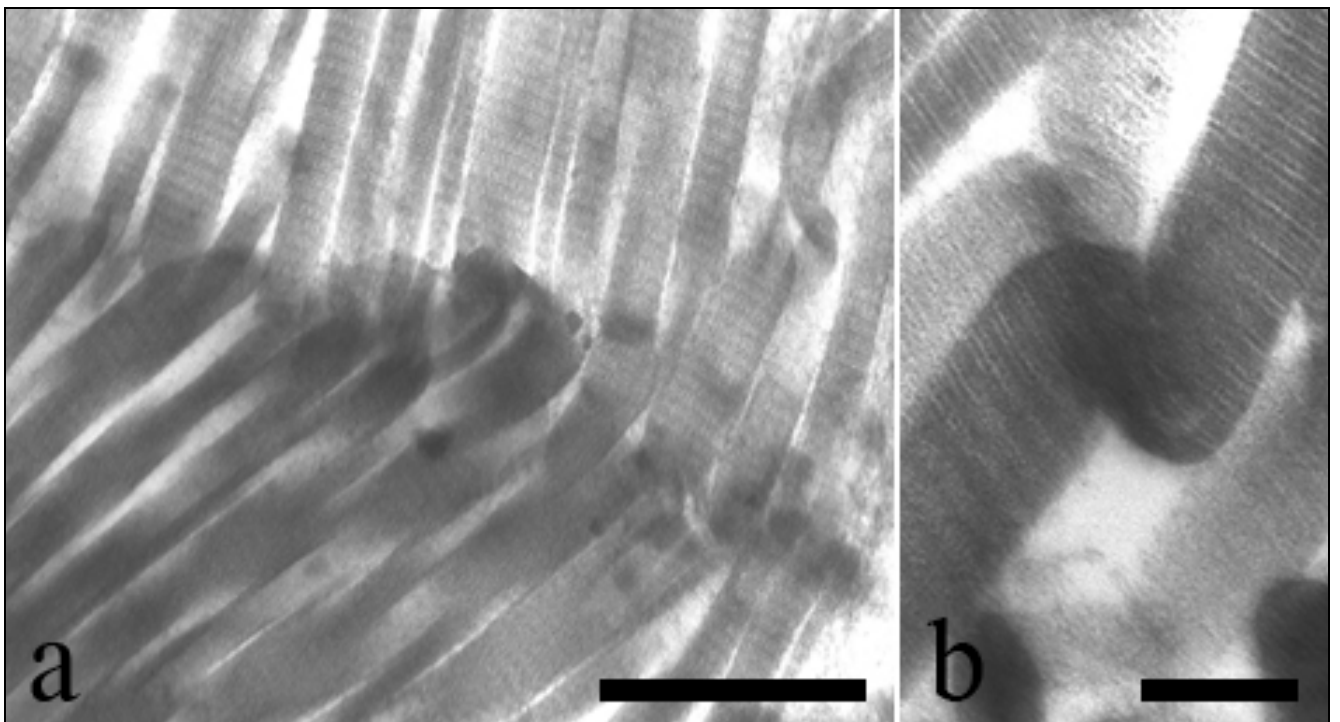


Figura 14 – Immagini a elevato ingrandimento ottenute al TEM: (a) dopo stiramento la maggior parte delle fibrille collagene appaiono distese pur conservando i crimps fibrillari che mantengono inalterate le loro caratteristiche ultrastrutturali (barra della scala = 1  $\mu\text{m}$ ; in (b) si può osservare una fibrilla ritorta e piegata con assenza di periodicit  assiale nel punto di torsione. Barra della scala = 250 nm

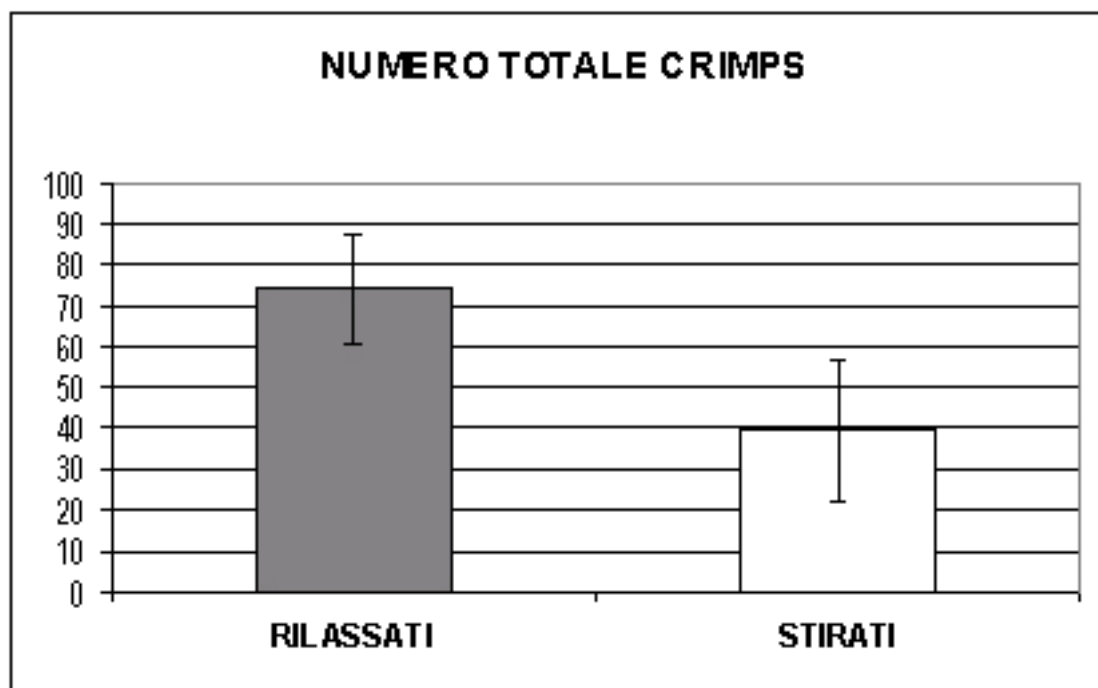


Figura 15 - Numero dei crimps nei tendini calcaneali rilassati e sottoposti a stretching. Dopo stiramento il numero dei crimps si riduce in modo significativo ( $P < 0.01$ ).

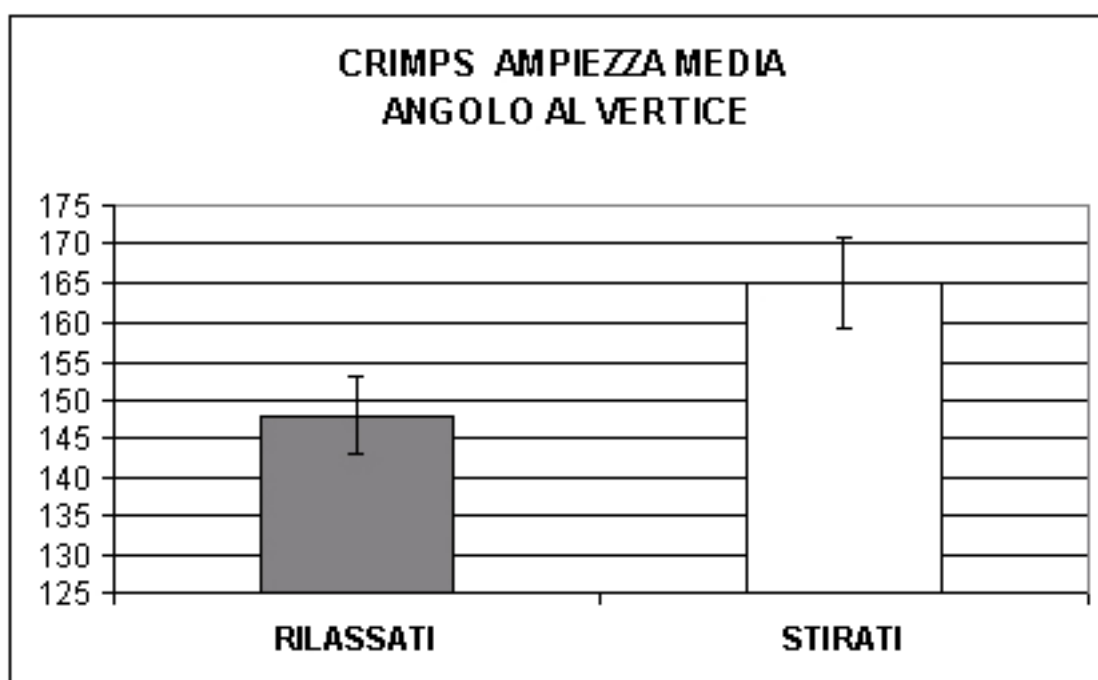


Figura 16 - Ampiezza media dell'angolo al vertice del crimp nei tendini calcaneali rilassati e sottoposti a stretching. Dopo stiramento l'ampiezza dell'angolo si riduce in modo significativo ( $P < 0.005$ ) in quanto i crimps tendinei subiscono una deformazione parziale o completa.